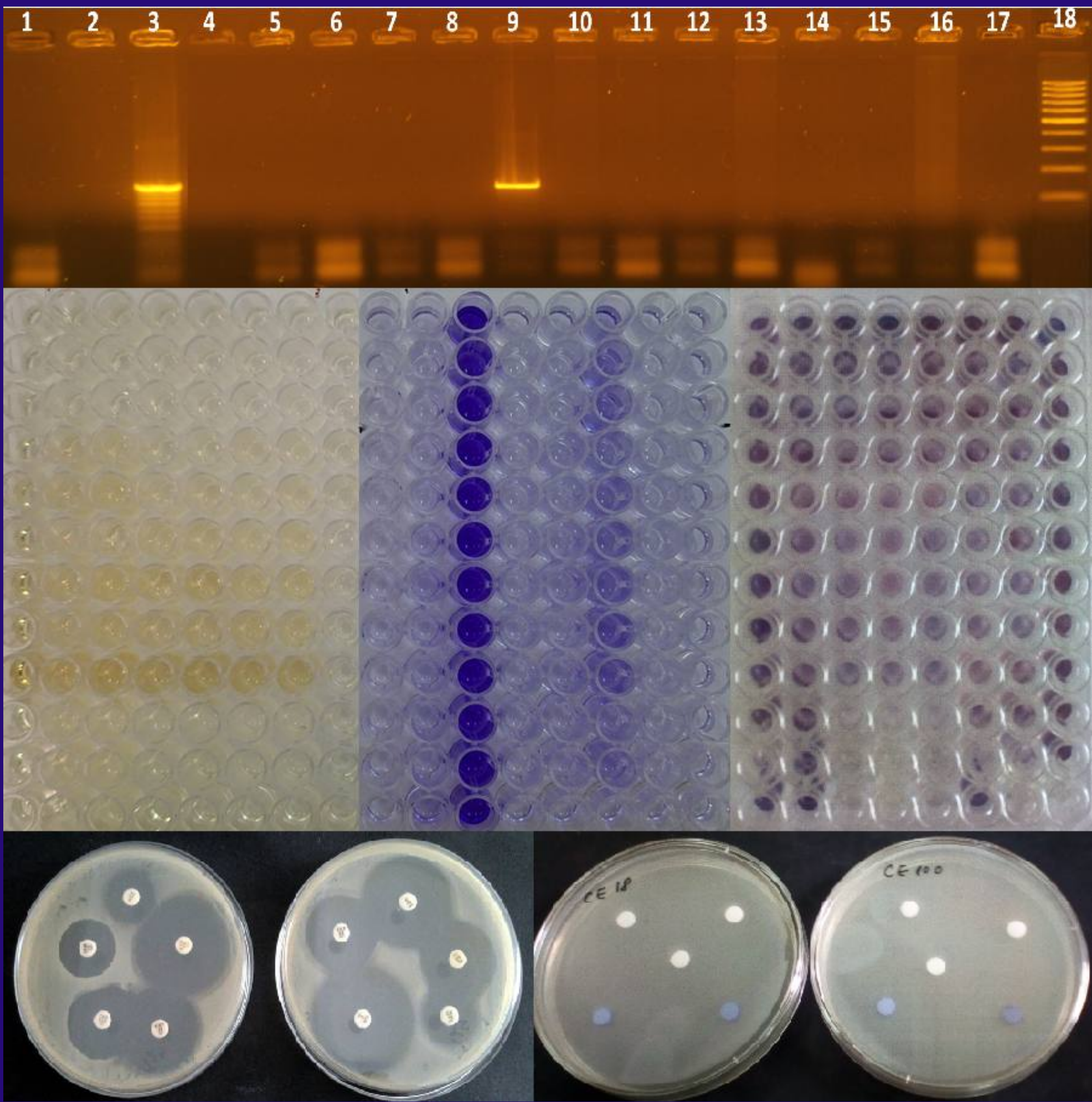
ANCA FARKAS

BIOTEHNOLOGII FARMACEUTICE

Ghid pentru lucrări practice



PRESA UNIVERSITARĂ CLUJEANĂ

ANCA FARKAS

BIOTEHNOLOGII FARMACEUTICE

GHID PENTRU LUCRĂRI PRACTICE

PRESA UNIVERSITARĂ CLUJEANĂ

2025

Referenți științifici:

Prof. univ. dr. Anca Butiuc – Universitatea Babeş-Bolyai Cluj-Napoca, Facultatea de Biologie şi Geologie, Departamentul de Biologie Moleculară şi Biotehnologii

Conf. univ. dr. Marioara Nicoleta Carabă – Universitatea de Medicină și Farmacie V. Babeș Timișoara, Facultatea de Medicină

Șef de lucrări dr. Carmen Elena Pop – Universitatea de Medicină şi Farmacie Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca, Facultatea de Farmacie

ISBN 978-606-37-2335-3

Universitatea Babeş-Bolyai
Presa Universitară Clujeană
Director: Codruţa Săcelean
Str. Hasdeu nr. 51
400371 Cluj-Napoca, România
Tel./Fax: (+40)-264-597.401
E-mail: editura@ubbcluj.ro
http://www.editura.ubbcluj.ro/

PREFAȚĂ

Biotehnologiile farmaceutice au ca scop producerea de medicamente, utilizând procese de biosinteză şi bioconversie şi/sau tehnologii de inginerie moleculară. În domeniul biofarmaceutic sunt aplicate cele mai remarcabile descoperiri și invenţii, la interfaţa dezvoltării medicamentelor cu biotehnologia translaţională, biomedicina şi investigațiile farmacologice. Acest sector interdisciplinar reunește microbiologia cu sistemele biologiei sintetice, imunologia, biotehnologia analitică, medicina regenerativă, livrarea la ţintă a medicamentelor, farmacocinetica și farmacodinamica, etica biotehnologică și medicală, biotehnologia ambientală, bioinformatica și imunoinformatica.

O varietate de molecule bioactive disponibile în prezent pentru terapie sunt rezultatul biotehnologiilor farmaceutice: de la molecule mici precum antibioticele și alţi agenţi antimicrobieni, vitaminele, statinele, la diverse proteine imunogene utilizate în fomularea vaccinurilor, dar şi proteine terapeutice cum sunt anticorpii monoclonali, interferonii, interleukinele, factorii de creştere, factorii de coagulare, agenţii trombolitici, hormonii, enzimele și așa mai departe. La ora actuală, aproximativ unul din patru noi medicamente lansate pe piaţă este un produs biofarmaceutic. În mod convenţional, descoperirea unui nou medicament durează între 12 și 17 ani, doar unul din 5.000 până la 10.000 de compuși activi potenţiali ce intră în cercetare ajungând să fie aprobat pentru comercializare. Cercetarea în scopul identificării de molecule bioactive, împreună cu dezvoltarea noilor biofarmaceutice până la autorizare, sunt procese extrem de complexe, dinamice, reglementate la nivel naţional şi internaţional.

Prezentul ghid pentru lucrări practice este structurat în conformitate cu programa disciplinei Biotehnologii farmaceutice, predată studenților de la Facultatea de Biologie și Geologie, Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca, și corespunde cu tematica abordată la universitățile de profil, de la nivel național și internațional. Acest manual este destinat nu doar studenților biotehnologi, biologi și biochimiști, ci și studenţilor masteranzi și doctoranzi, precum și cercetătorilor implicaţi în domeniul farmaceutic și medical.

Disciplina Biotehnologii farmaceutice are ca obiectiv general cunoaşterea, înţelegerea şi aplicarea conceptelor și fundamentelor specifice obţinerii medicamentelor prin biosinteză, biotransformări și tehnici de manipulare genetică şi proteică. În cadrul lucrărilor de laborator, accentul este pus pe dobândirea abilităţilor practice, prin utilizarea diferenţiată a elementelor, tehnicilor şi instrumentelor proprii biotehnologiilor, aplicate în cercetarea și producţia farmaceutică. Sunt aprofundate prin protocoale experimentale cunoştinţele în legătură cu formularea, fabricarea, respectiv analiza şi controlul materiei prime şi a diferitelor forme farmaceutice. Dezvoltarea competenţelor de prelucrare și interpretare biostatistică și bioinformatică este facilitată de folosirea unor programe de calcul și platforme in silico. Mai mult, demonstrarea capacităţii de analiză şi sinteză este realizată prin oferirea de soluţii pentru unele întrebări și probleme ridicate la finalul fiecărei lucrări practice, precum și prin proiectarea şi întocmirea unui protocol de validare original, adaptat pentru o metodă analitică, un proces tehnologic sau un echipament ales de către student.

Ghidul pentru lucrări practice de biotehnologii farmaceutice cuprinde un set de metode caracteristice, ce acoperă diferite etape din viaţa unui medicament, de la fazele descoperirii timpurii

(identificarea ţintei terapeutice, screeningul cu randament ridicat, validarea metodelor de testare, identificarea compuşilor candidat), avansând către cercetarea preclinică (screeningul in silico al imunogenităţii, modelarea profilului ADMET și optimizarea moleculelor farmaceutice) și clinică (siguranţa și eficacitatea medicamentelor). Lucrările de laborator includ activităţi practice ce vizează procesarea în amonte (biosinteza compuşilor cu valoare terapeutică) și în aval (separarea și purificarea moleculei de interes, formularea medicamentelor), familiarizând totodată studenţii cu conceptul de validare farmaceutică, cu reglementările legale și etice ce guvernează industria farmaceutică, precum și cu regulile de bună practică în producţia medicamentelor, în laborator și în cercetarea clinică. Toate aceste cunoştinţe, abilităţi și competenţe sunt esenţiale în formarea viitorilor cercetători și specialişti ai industriei farmaceutice, capabili să contribuie la descoperirea și dezvoltarea unor noi medicamente sigure și eficiente.

REGULI DE PROTECŢIE A MUNCII ÎN LABORATOR

Lucrările practice din prezentul ghid includ diverse metode de lucru şi necesită dotări specifice laboratoarelor de analize fizico-chimice, microbiologice şi de biologie moleculară. Executarea cu succes a lucrărilor experimentale de biotehnologii farmaceutice, precum şi prevenirea accidentelor necesită, în mod obligatoriu, cunoaşterea specificului laboratorului, amenajările, dotările și regulile generale de protecţia muncii precum şi regulile de **protecţie a personalului, a probelor sau produselor şi a mediului înconjurător**. Aparatura şi instrumentele se manipulează conform instrucţiunilor cadrului didactic şi numai la indicaţia acestuia.

Reguli generale în laborator

- Este strict interzis accesul persoanelor străine în laborator.
- Este interzisă intrarea studenţilor în laborator în lipsa permisiunii cadrului didactic.
- Este obligatorie purtarea echipamentului de protecţie solicitat de cadrul didactic, în funcţie de specificul lucrărilor practice desfăşurate (halat cu mâneci lungi, mănuși, mască, ochelari de protecţie).
- Nu se va intra în laborator dacă pe ușă există avertizare că lămpile UV pentru sterilizarea aerului şi a suprafeţelor sunt în funcţiune!
- Înainte și după terminarea activităţilor experimentale, mâinile se spală cu apă caldă și săpun și se dezinfectează cu soluțiile dezinfectante special destinate, disponibile în laborator.
- Aparatura şi obiectele din dotare se manipulează conform instrucţiunilor.
- Reactivii, mediile de cultură deshidratate şi soluţiile din laborator se manipulează cu atenţie pentru a se evita contactul acestora cu pielea ori cu hainele, sau inhalarea vaporilor ori a pudrelor.
- Echipamentele și obiectele fierbinţi se manipulează cu atenţie.
- Orice incident sau posibil accident se semnalează de urgență cadrului didactic pentru aplicarea măsurilor de prim ajutor!
- Dispensarea materialelor se va realiza după următoarele reguli:
  - Consumabilele reutilizabile din laboratorul de microbiologie se decontaminează, se spală și se sterilizează (cutii Petri din sticlă, eprubete, flacoane din sticlă sau plastic reutilizabil, vârfuri de pipetă etc);
  - Deșeurile microbiologice (culturi microbiene și obiecte contaminate) se decontaminează prin autoclavare;
  - Deșeurile rezultate din analiza moleculară (geluri de agaroză și obiecte contaminate cu bromură de etidiu) se colectează separat în vederea incinerării.
- Înainte de părăsirea laboratorului se verifică să nu existe aparate în funcţiune sau robinete de apă și gaz deschise sau becurile aprinse! Atenţie la camera termostatată!
- Fiecare student are obligația de a-și supraveghea spațiul de lucru, păstrând ordinea și curățenia:
  - Fiecare student va alege și va păstra același loc de lucru;
  - Orice alterare a diferitelor aparate, dotări sau obiecte adiacente spațiului de lucru va fi semnalată cadrului didactic.

Protecţia împotriva riscurilor legate de prezenţa agenţilor fizici

• Se va evita expunerea directă și/sau neprotejată la temperaturi ridicate emise de echipamentele și obiectele din laborator, pentru evitarea riscului de arsuri:

- Aparatura utilizată pentru sterilizare și decontaminare (etuve, autoclave, băi de apă) și echipamentele, flacoanele, soluţiile sterilizate sunt fierbinţi imediat după terminarea programelor de funcţionare, iar la deschiderea autoclavului se degajă aburi. Se evită expunerea directă în timpul deschiderii și se utilizează mănuși speciale pentru cuptor;
- Becurile de gaz se utilizează corespunzător, evitându-se expunerea la flacăra deschisă, atingerea ansei, gurii eprubetelor, flacoanelor sau a altor instrumente flambate care pot fi fierbinţi;
- Flacoanele cu medii de cultură, soluţii sau extracte încălzite cu ajutorul agitatorului magnetic cu încălzire, a băii de apă sau a cuptorului cu microunde sunt fierbinţi. Mai mult, examinarea prin agitare a conţinutului duce la supraîncălzirea conţinutului, amplificând riscul de arsuri prin refluare sau inhalarea aburilor. Se manipulează utilizând protecţii din silicon și se agită cu atenţie;
- Este interzisă aplecarea capului deasupra vaselor aflate în fierbere;
- Flacoanele cu soluţii fierbinţi se ţine înclinate într-o parte, nici spre sine, nici spre vecin, pentru a se evita stropirea în caz de supraîncălzire;
- Este interzisă păstrarea substanţelor inflamabile şi a celor volatile în apropierea aparatelor care produc radiaţii termice;
- Becurile de gaz nu se lasă aprinse fără supraveghere.

• Se va evita expunerea la radiaţii ultraviolete emise de aparatura din laborator: lămpi dezinfectante mobile, lămpi de fluorescenţă, hote microbiologice, transiluminatoare etc. Măsuri specifice:

- Nu se intră în laborator dacă sunt afișate semnale de avertizare că lămpile UV pentru sterilizarea aerului şi a suprafeţelor sunt în funcţiune!
- Nu se porneşte lampa UV în hota clasa 100 fără închiderea hotei cu husa de protecţie!
- În cazul utilizării lămpilor de fluorescenţă sau a transiluminatorului, este obligatorie purtarea echipamentului de protecţie (halat cu mâneci lungi, mănuși, ochelari de protecţie UV).

Protecţia împotriva riscurilor legate de prezenţa agenţilor chimici

• Se va consulta în prealabil fişa tehnică de securitate pentru reactivii utilizaţi în laborator.

• Se va evita riscul de arsuri cu substanţe chimice prin purtarea echipamentului de protecţie și manipularea responsabilă a reactivilor și soluţiilor din laborator. Măsuri specifice:

- Reactivii, mediile de cultură deshidratate şi soluţiile din laborator se manipulează cu atenţie pentru a se evita contactul acestora cu pielea ori cu hainele, sau inhalarea vaporilor ori a pudrelor;
- Utilizarea solvenţilor organici în extracţiile lichid-lichid și purificarea compușilor de interes se va realiza cu echipament de protecţie (mănuşi şi mască), sub nişa cu ventilaţie, fără a inhala vaporii rezultaţi;
- Acizii concentraţi se manipulează cu mare atenţie, sub nişă;

- Prepararea soluţiilor ce implică reacţii exoterme se realizează utilizând flacoane termorezistente;
- Prepararea soluţiilor diluate de acid sulfuric se realizează întotdeauna prin introducerea acidului sulfuric concentrat în apă, în fir subţire, cu agitare continuă.

• În cazul utilizării bromurii de etidiu:
- Se va evita atât contactul direct cu soluţia de bromură de etidiu, cu gelul de electroforeză, cu soluţia tampon, cu vârfurile de pipetă etc;
- Se va evita contaminarea laboratorului şi a echipamentelor (mese, corpul pipetelor, pixuri, tastatură, robinet etc.).

Protecţia împotriva riscurilor legate de prezenţa agenţilor biologici

Pentru a preveni contaminarea persoanelor şi răspândirea germenilor potenţial infecțioşi, precum și pentru a evita infectarea probelor aflate în lucru, trebuie respectate anumite reguli de ordine interioară:

• Este obligatoriu de păstrat circuitul în laborator;

• Nu este permisă fuga sau mersul rapid prin laborator;

• Intrarea în laborator și participarea la lucrările practice se va face numai după audierea și însușirea regulilor de protecție a muncii (dovedită prin semnătură pe un proces verbal);

• Intrarea în laborator necesită purtarea echipamentului de protecție (obligatoriu halat cu mâneci lungi și suplimentar, după caz, mănuși, mască, bonetă, ochelari de protecţie). Se recomandă ca echipamentul de protecție să fie păstrat separat de hainele utilizate în exterior;

• Mâinile se spală cu apă caldă și săpun și se dezinfectează cu soluțiile dezinfectante special destinate, disponibile în laborator.

• Toate produsele biologice vor fi considerate ca potențial infectante;

• Consumarea de alimente și băuturi, ducerea mâinilor la față în timpul lucrului, fumatul în laborator sunt strict interzise;

• Este interzisă introducerea în gură a oricărui obiect din laborator, inclusiv a pipetelor din sticlă sau plastic, chiar și sterile;

• Este interzisă împrăştierea prin laborator a obiectelor de uz personal: hainele, genţile etc. vor fi depozitate pe cuier;

• Este permisă aducerea în laborator a materialelor de scris și a telefoanelor mobile, având grijă să se prevină contaminarea încrucișată;

• Activităţile derulate în laboratorul de microbiologie şi biotehnologii implică posibil contact cu material infecţios! Pentru a preveni accidentele de lucru, este necesară urmarea strictă a protocoalelor de lucru și a regulilor de dezinfecție și antisepsie:

- Însămânțările se fac la flacără, flambându-se gâtul recipientelor la deschidere și la închidere;
- Ansa se sterilizează înainte și după folosire prin încălzire la roșu, iar portansa se flambează;
- Pipetele, vârfurile de pipete, lamele și lamelele contaminate nu se decontaminează la flacără, ci se scufundă după folosire în recipiente cu soluție dezinfectantă existente în laborator;
- Pipetarea cu gura este interzisă! Se vor folosi pipete automate sau dispozitive de pipetare adecvate;

- Cutiile Petri, eprubetele, flacoanele și microplăcile cu culturi sau alte recipiente, precum și materialele contaminate se depozitează după lucru în camera de decontaminare, pe masa de infecte, pentru decontaminarea ulterioară;

- Manipularea aparatelor se va face respectând instrucțiunile de folosire specifice;

- Atenție la manipularea substanțelor caustice şi inflamabile, precum şi a flăcării de gaz!

- În cazul răspândirii accidentale a materialului infecțios, va fi anunțat cadrul didactic care conduce lucrările și care va indica măsurile de dezinfecție;

- Orice incident se semnalează de urgență cadrului didactic!

- După terminarea activităţilor, mâinile se spală cu apă caldă și săpun și se dezinfectează cu soluțiile dezinfectante special destinate, disponibile în laborator.

Principalele măsuri de prim ajutor în laborator

În cazul oricărui tip de accident, prima măsură o constituie încetarea expunerii, urmată de acţiuni specifice, după caz:

- Intoxicaţiile minore prin inhalare se combat prin inhalare de aer curat (în curte) și repaus, sub supraveghere;
- Arsurile termice minore se tratează cu soluţie sau spray protector din trusa de prim ajutor;
- Arsurile minore cu substanţe chimice se tratează prin spălarea cu multă apă și aplicarea soluţiilor neutralizante specifice (soluţie de bicarbonat de sodiu 2% pentru arsurile cu acizi și respectiv soluţie de acid acetic 2% pentru arsurile cu baze);
- Expunerea la agenţi biologici se tratează prin aplicarea unui dezinfectant concentrat, se absoarbe cu ajutorul unui prosop de hârtie (care se va decontamina corespunzător), se spală cu apă caldă și săpun și se reaplică dezinfectantul;

Procedura recomandată în cazul împrăștierii materialului infecţios implică izolarea zonei afectate, evacuarea persoanelor din perimetrul respectiv, evitarea aerosolizării și aplicarea măsurilor de decontaminare cu utilizarea echipamentului individual de protecție. Măsuri specifice:

- Se colectează deșeurile solide, se absorb cu prosoape de hârtie deșeurile lichide;

- Se aplică un dezinfectant concentrat dinspre margini spre centrul zonei contaminate, se lasă să acţioneze 10-15 minute, apoi se spală și se sterilizează zona cu ajutorul lămpilor UV;

- Materialele contaminate se elimină pe circuitul deșeurilor infecțioase.

Reglementarea industriei farmaceutice și autorizarea medicamentelor. Informarea cu privire la medicamente. Monografiile plantelor medicinale

Conţinut şi competenţe:
- Procedura autorizării medicamentelor și dispozitivelor medicale
- Informaţiile publice cu privire la rezultatele studiilor clinice
- Documentele destinate informării personalului medical şi pacienţilor
- Prospectul medicamentului şi raportarea reacţiilor adverse
- Suplimentele alimentare. Produsele pe bază de plante medicinale

Principiul lucrării

Disponibilitatea comercială a medicamentelor este reglementată legal. Rezumatul informaţiilor din studii clinice este accesibil publicului larg. Documentarea din surse corecte şi actualizate este esenţială atât pentru personalul medical cât şi pentru pacient. Prospectul medicamentului furnizează informaţii utile şi actualizate în permanenţă. Farmacovigilenţa: semnificaţia şi importanţa raportării efectelor adverse.

Agenția Europeană pentru Medicamente și autorizarea medicamentelor

Agenția Europeană pentru Medicamente (*European Medicines Agency*, EMA) este o agenție descentralizată a Uniunii Europene (UE), responsabilă pentru evaluarea științifică, supravegherea și monitorizarea siguranței medicamentelor. În cadrul agenţiei, o serie de comitete dedicate adoptă avize sau recomandări şi publică rezultate cu privire la medicamente şi dispozitive medicale: Comitetul pentru produse medicamentoase de uz uman, Comitetul de evaluare a riscurilor de farmacovigilență, Comitetul pentru produse medicamentoase de uz veterinar, Comitetul pentru produse medicamentoase orfane, Comitetul pentru produse medicinale din plante, Comitetul pentru terapii avansate şi respectiv Comitetul pediatric. O sursă validă de informare pentru pacienţi o reprezintă *European Patients' Academy on Therapeutic Innovation* (EUPATI). EUPATI este o fundație independentă non-profit care oferă educație și instruire pentru a crește capacitatea pacienților și a reprezentanților pacienților de a înțelege și de a contribui semnificativ la cercetarea și dezvoltarea medicamentelor și pentru a îmbunătăți disponibilitatea informațiilor medicale (www.eupati.eu).

Medicamentele din UE sunt autorizate printr-una din cele două proceduri de autorizare: centralizată sau naţională. Numai medicamentele cărora le-a fost acordată autorizaţia de punere pe piaţă pot fi comercializate în Spaţiul Economic European (SEE). EMA şi respectiv Agenţia Naţională a Medicamentului şi Dispozitivelor Medicale (ANMDM) din România nu doar autorizează medicamente, ci au de asemenea rolul de a furniza informații transparente și utile despre medicamentele dezvoltate de către companiile farmaceutice. La încheierea fiecărui studiu clinic este realizat un raport detaliat al studiului, care adoptă formatul stabilit de către autoritățile de reglementare. Fiecare raport are, în general, câteva sute de pagini, iar accesul este, în general, limitat la sponsor și autoritățile de reglementare care evaluează cererea de autorizare a punerii pe piață. Rezumatul informațiilor incluse în raportul studiului clinic intră în domeniul public pe mai multe căi.

Registrele de studii clinice. În UE, derularea studiilor clinice se realizează conform Directivei UE 20/2001 și a amendamentelor sale. Baza de date *European Union Clinical Trials Register* (EudraCT, www.clinicaltrialsregister.eu) colectează informații privind toate studiile clinice efectuate în statele membre. Începând din iulie 2014, această platformă online pune la dispoziția publicului, de asemenea, rezultatele rezumative ale studiilor clinice. Pentru studiile efectuate în UE după data de 1 ianuarie 2015, toate aceste rezultate trebuie publicate, indiferent de implicațiile lor pozitive sau negative. Începând cu data de 31 ianuarie 2025, sponsorii studiilor clinice în derulare vor transfera informațiile într-un nou sistem european centralizat, *Clinical Trials Information System* (CTIS). Organizația Mondială a Sănătății stabilește standarde internaționale privind înregistrarea și raportarea tuturor studiilor clinice și centralizează informațiile prin intermediul platformei *International Clinical Trials Registry Platform* (https://www.who.int/clinical-trials-registry-platform). În Statele Unite ale Americii (SUA), registrul ClinicalTrials.gov (www.clinicaltrials.gov) are o funcție similară.

Rapoartele publice europene de evaluare. Atunci când autorizarea unui nou medicament este solicitată prin procedura centralizată, un raport public de evaluare este redactat de către EMA. Acest raport este publicat pe site-ul web EMA după adoptarea unei decizii de aprobare sau respingere a cererii de autorizare, oferind informații publice privind medicamentul, inclusiv despre modul în care acesta a fost evaluat, împreună cu un rezumat accesibil publicului larg. Informațiile confidențiale despre fabricarea produsului nu sunt incluse. Rapoartele sunt actualizate periodic pentru a reflecta cele mai recente informații privind reglementările aplicabile medicamentelor.

Rezumatul caracteristicilor produsului reprezintă un document esențial în procesul de autorizare a unui medicament nou. Acest document este destinat personalului medical și sumarizează informațiile relevante, necesare pentru ca acesta să poată informa pacienții despre:

- beneficiile și riscurile medicamentului ales;
- îndrumări detaliate privind utilizarea, împreună cu avertismente relevante referitor la ce trebuie făcut și respectiv evitat în perioada de administrare a medicamentului.

Prospectul medicamentului este destinat utilizatorilor sau pacienților. În funcție de reglementările naționale, aceste documente pot fi disponibile pe internet, la autoritățile de reglementare, pe site-urile producătorilor sau pe site-urile gestionate de către organizații independente. Compania farmaceutică are obligația de a furniza un prospect al medicamentului care conține toate informațiile din rezumatul caracteristicilor produsului, care sunt necesare și utile pentru pacient. Ordinea și conținutul prospectului sunt strict reglementate astfel încât, după citirea acestuia, pacientul trebuie să înțeleagă pe deplin ce este medicamentul, la ce servește și cum trebuie utilizat. Secțiunile prospectului medicamentului sunt următoarele:

- Ce este medicamentul și pentru ce se întrebuințează;
- Ce trebuie să știe pacientul înainte de a utiliza medicamentul: contraindicații, interacțiuni cu alimentele sau alte medicamente, măsuri de precauție;
- Modul de administrare/utilizare a produsului respectiv;
- Posibilele efecte secundare;
- Modul de depozitare a medicamentului;

- Conținutul pachetului și alte informații (precum producătorul și titularul autorizației de punere pe piață).

Informațiile privind potențialele efecte secundare sau reacțiile adverse ale medicamentului reprezintă un element important al prospectului. Este posibil ca nu toate reacţiile adverse să fie cunoscute în momentul aprobării unui medicament. Cele mai rare pot apărea abia după ce medicamentul este administrat unui număr mare de pacienți sau după perioade îndelungate. Este important ca pacienții să fie implicați în supravegherea noilor reacţii adverse. Legislația privind farmacovigilența impune informarea pacienților privind importanța raportării noilor reacţii adverse. Toate prospectele medicamentelor trebuie să conțină textul standard: „Dacă manifestați orice reacții adverse, adresați-vă medicului dumneavoastră, farmacistului sau asistentei medicale. Acestea includ orice posibile reacții adverse nemenționate în acest prospect. De asemenea, puteți raporta reacțiile adverse direct prin intermediul sistemului național de raportare. Raportând reacțiile adverse, puteți contribui la furnizarea de informații suplimentare privind siguranța acestui medicament."

Pacienții au opțiunea de a raporta efectele adverse medicului sau farmacistului. În România, pe site-ul ANMDM există opţiunea de raportare directă online (https://www.anm.ro/medicamente-de-uz-uman/farmacovigilenta/raporteaza-o-reactie-adversa/). EMA realizează o monitorizare centralizată a siguranței medicamentelor pe tot parcursul ciclului lor de viață, transmite rapoarte Comisiei Europene şi actualizează anual lista medicamentelor de uz uman care fac obiectul unei monitorizări suplimentare. Informațiile despre efectele secundare raportate sunt disponibile publicului în baza europeană de date privind rapoartele despre reacțiile adverse suspectate la medicamente (Farkas, 2021).

Modificările informațiilor privind medicamentele

Orice nou medicament este monitorizat îndeaproape după ce devine disponibil pentru pacienți, prin studiile post-marketing. Atât agențiile de reglementare, cât și companiile farmaceutice colectează rapoarte privind reacţiile adverse. Pe baza informațiilor post-autorizare colectate în rapoartele periodice de actualizări privind siguranța, raportul dintre beneficii și riscuri este reconsiderat și reevaluat regulat. Orice noi informații privind siguranța rezultate în urma acestor reevaluări pot duce la actualizări ale rezumatului caracteristicilor produsului și prospectului medicamentului. Conținutul relevant din rezumatul celor două documente poate fi modificat doar după depunerea unei cereri pentru variație. Eventualele modificări pot fi inițiate de către producător sau autoritățile de reglementare; de exemplu, în cazul apariției unor informații noi privind siguranța sau eficacitatea produselor. Inițiativa de reglementare poate fi luată în urma unui referat inițiat de către autoritățile de reglementare din statele membre UE sau de către Comisia Europeană și implică considerații științifice din comitetele EMA. Este importantă desfășurarea unei acțiuni armonizate la nivelul UE. Toți pacienții și medicii trebuie să aibă acces la orice noi informații privind beneficiile sau riscurile produsului farmaceutic respectiv.

În cazul unor reacţii adverse grave nou sesizate, pot fi necesare acțiuni urgente. Astfel, poate fi inițiată o Procedură de urgență a UE, de către un stat membru sau de către Comisia Europeană. Rezultatul poate consta în schimbări majore ale condițiilor pentru autorizația de punere pe piață, suspendarea sau chiar anularea acesteia. Cel mai frecvent, acest tip de procedură urgentă de siguranță la nivelul UE va determina publicarea de către EMA a unei comunicări privind siguranța și actualizarea informațiilor medicamentului în cauză (www.eupati.eu).

Suplimentele alimentare și produsele din plante medicinale

Suplimentele alimentare nu sunt supuse rigorilor de cercetare și autorizare specifice medicamentelor. Totuși, Comitetul pentru medicamente din plante medicinale (*Committee on Herbal Medicinal Products*, HMPC) din cadrul EMA evaluează toate informațiile disponibile, inclusiv datele non-clinice și clinice, dar și utilizarea și experiența de lungă durată documentate în UE și elaborează monografiile plantelor medicinale. Monografia reprezintă avizul științific al HMPC privind datele de siguranță și eficacitate despre o substanță pe bază de plante și preparatele sale destinate uzului medicinal. Monografiile UE oferă toate informațiile necesare pentru utilizarea unui medicament care conține o anumită substanță sau preparat din plante:

- La ce se folosește produsul pe bază de plante;
- Cui este destinat produsul pe bază de plante;
- Informații privind siguranța, cum ar fi informații privind reacțiile nedorite și interacțiunile cu alte medicamente.

Monografiile formează baza pentru informațiile individuale obligatorii despre medicament, cum ar fi rezumatul caracteristicilor produsului și prospectul. Acestea sunt publicate împreună cu alte documente, inclusiv un raport de evaluare care conține recenzii ale tuturor datelor disponibile relevante pentru utilizarea medicamentoasă a substanței sau preparatelor din plante.

ACTIVITATE EXPERIMENTALĂ

1. Analiza bazelor de date pentru studii clinice

Accesaţi bazele de date www.clinicaltrialsregister.eu şi www.clinicaltrials.gov şi verificaţi sumar studiile clinice în care este testat acidul acetilsaliciclic. Repetaţi căutarea pentru acid salicilic.

2. Studiul prospectului medicamentului

Studiaţi în autorizaţiile de punere pe piaţă prospectele medicamentelor Aspirin® (https://www.anm.ro/_/_PRO/PRO_11322_11.01.19.pdf) şi Aspenter® (https://www.anm.ro/_/_PRO/PRO_8517_14.01.16.pdf), urmărind în mod special: denumirea comună internaţională a substanţei medicamentoase, doza de substanţă activă, compoziţia, indicaţiile, modul de administrare, interacţiunile medicamentoase şi efectele adverse posibile.

3. Studiul monografiilor UE pentru plante medicinale

Studiaţi rapoartele EMA/HMPC/434892/2010 şi EMA/HMPC/80628/2016 urmărind indicaţiile terapeutice, studiile clinice şi posibilele efecte adverse ale preparatelor din *Filipendula ulmaria* (creţuşca) şi respectiv *Salix* sp. (salcia).

4. Studiul nomenclatorului medicamentelor de uz uman al ANM

Accesaţi platforma https://www.anm.ro/medicamente-de-uz-uman/nomenclatorul-medicamentelor-de-uz-uman/ şi verificaţi lista medicamentelor aprobate pentru comercializare după denumirea comercială Aspirin. Efectuaţi o nouă căutare după denumirea comună internaţională (DCI) acidum acetylsalicylicum. Analizaţi comparativ medicamentele disponibile pe piaţă.

Întrebări și exerciţii

1. Aspirin® sau Aspenter®? Care sunt indicaţiile acestor medicamente, asociate cu dozajul substanţei active? Care este modul de administrare recomandat? Încercaţi să explicaţi repoziţionarea pe piaţă a unuia din cele două medicamente.

2. De ce există interacţiuni la administrarea acestor medicamente? Care sunt efectele adverse? De ce se impun precauţii şi atenţionări speciale?

3. Ce alte medicamente cu administrare orală cunoașteţi, având indicaţii terapeutice similare celor cu substanţa activă acidum acetylsalicylicum 500 mg?

4. Conform informaţiilor disponibile în platformele dedicate studiilor clinice, care sunt indicaţiile terapeutice pentru care este studiat acidul acetilsalicilic?

5. Pentru ce indicaţii terapeutice sunt utilizate preparatele din creţușcă și respectiv salcie, conform monografiilor UE? Ce studii clinice au fost efectuate pe astfel de preparate?

6. Care sunt diferenţele dintre un medicament și un supliment alimentar? Dar între un supliment alimentar și o plantă medicinală?

De la salicină la aspirină. Extracţia salicinei din scoarţa de salcie. Testarea semicantitativă a acidului salicilic.

Activităţi şi competenţe:
- Formularea medicamentelor. Substanţa medicamentoasă şi acţiunea terapeutică
- Extracţia principiilor active, transformări prin reacţii de hidroliză şi oxidare
- Evidenţierea acidului salicilic prin colorimetrie
- Analiza semicantitativă a compuşilor în extracte şi soluţii

Principiul lucrării

Salicina este un compus natural bioactiv utilizat ca precursor al acidului salicilic. Prin reacţii de hidroliză şi oxidare, din salicină se obţine acid salicilic. Acidul salicilic reacţionează cu clorura ferică, rezultând un compus de culoare violet, a cărui concentraţie poate fi estimată semicantitativ prin comparaţie cu intensitatea culorii în soluţii etalon.

De la salicină la acid acetilsalicilic. Consideraţii farmacologice. Controlul de calitate

Salicina este o β-glicozidă alcoolică extrasă din diverse materiale vegetale. A fost izolată pentru prima oară în anul 1828, iar acidul acetilsalicilic a fost sintetizat chimic în 1897 (Desborough şi Keeling, 2017). Salicina şi alţi metaboliţi secundari din grupul saliciglicozidelor se găsesc în ramuri, scoarţă, frunze şi flori de *Salix* sp., *Populus* sp., *Spiraea* sp., *Filipendula* sp. şi în castoreum (Carpa şi colab., 2022). Rapoartele HMPC din cadrul EMA a publicat concluziile ştiinţifice rezultate din date clinice şi toxicologice privind utilizarea medicinală a preparatelor din *Filipendula ulmaria* (EMA/HMPC/434892/2010) şi *Salix* sp. (EMA/HMPC/80628/2016).

Salicina este descrisă ca promedicament (*prodrug*) al acidului salicilic (Akao şi colab., 2002; Tawfeek şi colab., 2021). Promedicamentul reprezintă un compus care este metabolizat la o formă farmacologic activă după administrarea în organism. Promedicamentele sunt de obicei utilizate pentru a optimiza proprietăţile fizico-chimice (solubilitatea, stabilitatea în mediul acid), pentru a îmbunătăţi farmacocinetica (absorbţie, distribuţie, metabolizare şi excreţie), pentru a reduce frecvenţa şi gravitatea efectelor adverse prin diminuarea toxicităţii sau pentru a asigura livrarea la ţintă a substanţei medicamentoase. Aceste tipuri de medicamente sunt concepute pentru a furniza o biodisponibilitate superioară comparativ cu formele farmacologic active. În urma ingestiei preparatelor medicinale, transformările salicilglicozidelor la salicină şi ulterior la alcool salicilic (saligenină) implică reacţii de hidroliză la nivelul tubului digestiv, urmate de reacţii de oxidare în sânge şi ficat, ce au ca rezultat formarea acidului salicilic (Figura 1).

Salicina are proprietăţi antiinflamatorii, analgezice şi antipiretice. Acidul salicilic este un agent keratolitic, comedolitic şi bacteriostatic, cu proprietăţi antiinflamatorii, utilizat în preparate medicamentoase pentru uz extern. În tehnologia farmaceutică, salicina este de asemenea utilizată ca materie primă, fiind precursor pentru obţinerea acidului acetilsalicilic (Figura 2), compus cu proprietăţi antiinflamatorii, analgezice şi antipiretice având efecte farmacologice superioare salicinei. Printre reacţiile adverse cele mai frecvente raportate la administrarea de acid acetilsalicilic sunt

iritaţiile gastrice, microhemoragiile şi sângerările. Supradozarea are efecte toxice, iar medicamentele pe bază de salicilaţi nu sunt indicate copiilor, datorită riscului de apariţie a sindromului Reye.

Hidroliza acidă a salicinei este accentuată la pH scăzut și temperaturi ridicate (Toiu și colab., 2011; Clay și McLeod, 2012; Nekhoroshev și colab., 2020). Compusul de culoare violet ce rezultă în urma reacţiei acidului salicilic cu clorura de fier (III) (Figura 3) se datorează grupării fenol, care lipsește la acidul acetilsalicilic. Prin urmare, testul rapid este aplicat pentru a verifica stadiul procesului în sinteza chimică a acidului acetilsalicilic, respectiv cantitatea de acid salicilic neconsumat. De asemenea, o reacţie pozitivă la testarea cu $FeCl_3$, aplicată pentru a testa calitatea şi stabilitatea medicamentelor conţinând acid acetilsalicilic indică fie impurificarea, fie degradarea acestora. Reacţia poate fi aplicată pe probe de urină pentru a detecta o eventuală intoxicaţie cu salicilaţi (Hoffman şi colab., 2002).

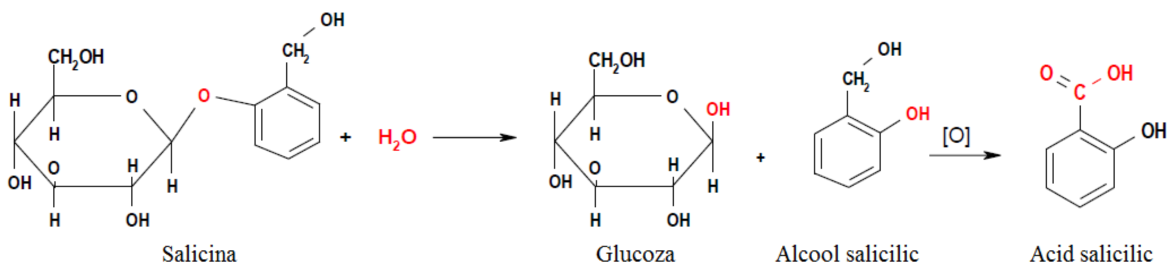


Figura 1. Transformările salicinei la acid salicilic

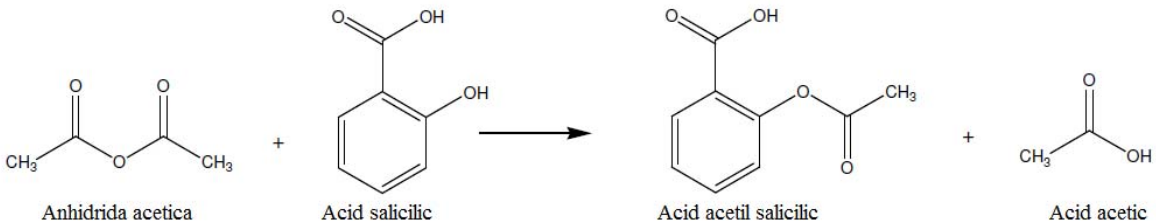


Figura 2. Sinteza chimică a aspirinei

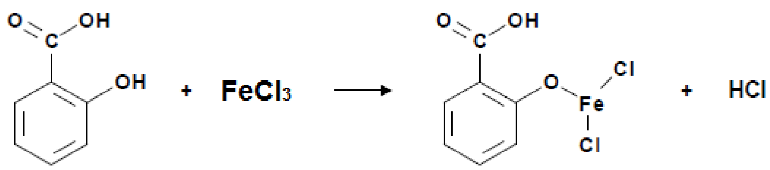


Figura 3. Compuşii rezultaţi din reacţia acidului salicilic cu clorura ferică

ACTIVITATE EXPERIMENTALĂ

Necesar

- Material vegetal: *Salicis cortex*, *Populi gemmae*, *Filipendulae ulmariae herba* etc
- Etanol 50% (100 ml)
- Acid salicilic (0,01 g)
- Soluţie $FeCl_3$ 0,1M (10 ml)
- Soluţie HCl 1M (10 ml)
- Pahare Erlenmeyer 100 ml
- Tuburi Falcon 50 ml

- Eprubete 10x100 mm și 16x150 mm
- Cilindri gradaţi 25 ml, 100 ml
- Pipete, pipete Pasteur
- Foarfece, pensetă, mojar
- Pix marker permanent
- Echipament de laborator: balanţă, centrifugă, baie de apă

Mod de lucru

1. Recoltarea și pregătirea materialului vegetal

Calitatea materiei prime vegetale folosite pentru obţinerea de preparate galenice și medicamente trebuie să îndeplinească cerințele indicate în articolele ediției actuale a Farmacopeei Europene (Ph. Eur. 2023). Recoltarea, sortarea, uscarea, condiţionarea şi depozitarea materialelor vegetale se realizează în condiţii optime, în funcţie de principiile active ale plantei, fiind descrise în ghidurile de farmacognozie. Mai jos sunt rezumate câteva exemple.

- În cazul salciei se utilizează scoarța, ramurile tinere și frunzele. *Salicis cortex*: se colectează scoarţa de pe ramurile în vârstă de 3 – 4 ani, primăvara, în timpul circulaţiei abundente a sevei, când se desprinde uşor de la arborii speciilor *Salix alba, S. caprea, S. matsudana tortuosa, S. purpurea L., S. daphnoides Vill.* sau *S. fragilis L.*;

- *Populi gemmae*: mugurii de plop se recoltează iarna sau primăvara foarte devreme, în luna martie;

- De la creţușcă se utilizează florile sau frunzele. *Filipendulae ulmariae flos*: se recoltează inflorescenţele în lunile iunie-august.

Ulterior colectării, materialul vegetal se sortează și se usucă la umbră, în strat subţire, în amplasamente bine ventilate, la temperaturi mai mici de 40°C. Se păstrează în locuri ferite de umezeală.

2. Prepararea extractelor vegetale

Extracţia principiilor active din surse naturale se poate realiza prin procedee discontinue (clasice precum macerarea, percolarea, infuzarea, decocţia, sau prin metode mai performante precum extracţia accelerată cu solvent, extracţia asistată de microunde, extracţia cu fluid supercritic) şi procedee continue (extracţia continua cu solvenţi organici, percolarea continuă, extracţia Soxhlet). Macerarea în soluţii hidroalcoolice presupune utilizarea de material vegetal uscat, în cazul tincturilor, sau în stare proaspătă, la prepararea alcoolaturilor.

Se pregătește o serie de flacoane Erlenmeyer, corespunzător numărului de probe de analizat, și se notează. Se prepară extractele prin macerarea materialui vegetal (ramuri tinere și scoarţă de salcie provenind de la diferite specii, flori de creţuscă etc.):

- Se cântăreşte 1 g material vegetal şi se mărunţește;

- Se transferă în pahar Erlenmeyer;

- Se acoperă cu 10 ml soluție de etanol 50% şi 1 ml soluţie de HCl 1M şi se macerează 30 de minute prin încălzire la 80°C;

- Se transferă în tuburi Falcon și se centrifughează 1 minut la 4.000 rpm, echilibrând rotorul centrifugii.

3. Prepararea probelor de substanţe medicamentoase

- Se notează un număr de eprubete 10 x 100 mm, corespunzător numărului de preparate farmaceutice de tip medicament (comprimate cu acid acetilsalicilic) sau supliment alimentar (capsule cu salicină naturală) care urmează a fi testate;

- Pentru fiecare eşantion se prepară câte 2 ml soluţii de concentraţii variate, în apă distilată: 10% și 1% salicină pentru suplimente alimentare; 2% și 0,2% acid acetilsalicilic pentru tablete în perioada de valabilitate; 0,2% și 0,02% acid acetilsalicilic pentru tablete cu termenul de valabilitate expirat.

4. Prepararea soluţiilor etalon de acid salicilic

Se aliniază în stativ şi se etichetează 3 eprubete 10 x 100 mm, pentru soluţiile etalon de acid salicilic: I, II, III. Se prepară 2 ml soluţie de acid salicilic (acid 2-hidroxibenzoic) 0,2% în apă distilată. Ulterior, prin tehnica diluţiilor succesive, se realizează două diluţii zecimale. Vor fi necesari câte 2 ml din fiecare soluţie de acid salicilic:

- 0,2% (sol. I): 0,004 g acid salicilic la 2 ml apă distilată
- 0,02% (sol. II) – 2 ml
- 0,002% (sol. III) – 2 ml

5. Analiza semicantitativă a acidului saliciclic

- Se aliniază în stativ şi se etichetează un număr de eprubete 10 x 100 mm, corespunzător numărului de probe;

- Se transferă câte 2 ml din extractul centrifugat în fiecare eprubetă;

- Se adaugă câte o picătură de soluţie $FeCl_3$ în fiecare eprubetă conţinând 2 ml de soluţie etalon I, II și III;

- Se adaugă câte o picătură soluţie $FeCl_3$ în fiecare eprubetă conţinând 2 ml de extract vegetal, se compară cu seria etalon şi se notează observaţiile;

- Se adaugă câte o picătură soluţie $FeCl_3$ în fiecare eprubetă conţinând preparate farmaceutice, se compară cu seria etalon şi se notează observaţiile (Figura 4).

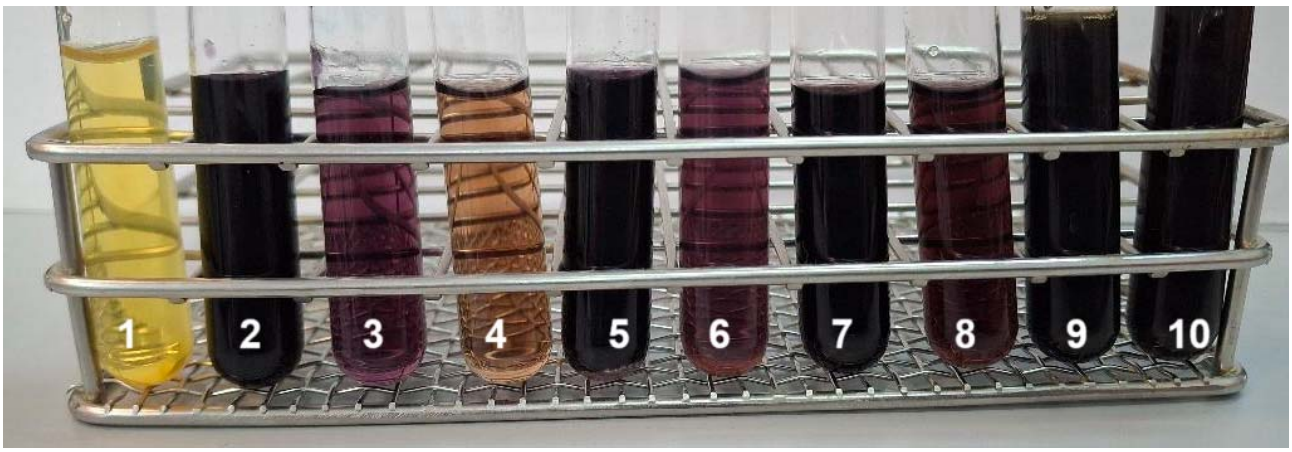


Figura 4. Testarea semicantitativă a acidului salicilic.1 – martor negativ; 2, 3, 4 – soluţii etalon acid salicilic 0,2%, 0,02% şi 0,002%; 5, 6 – soluţii 2% şi 0,2% acid acetilsalicilic, tabletă cu termenul de valabilitate expirat; 7, 8 – soluţii 0,2% şi 0,02% acid acetilsalicilic, tabletă efervescentă cu termenul de valabilitate expirat; 9, 10 – extracte alcoolice *Salicis cortex* 10% din *Salix alba* și *Salix matsudana tortuosa*

Întrebări şi exerciţii

1. Care sunt factorii care intervin în formularea medicamentelor?
2. Care sunt indicaţiile terapeutice ale preparatelor cu acid salicilic? Dar ale celor cu acid acetilsalicilic? Care sunt formele farmaceutice pentru care se optează în realizarea medicamentelor conţinând aceste substanţe active?
3. Comparaţi compoziţia drajeurilor de Aspirin® (https://www.anm.ro/_/_PRO/PRO_11322_11.01.19.pdf) cu cea a tabletelor efervescente de Aspirin® C forte (https://www.anm.ro/_/_RCP/RCP_15180_08.11.23.pdf). Care este rolul substanţelor auxiliare din aceste forme farmaceutice?
4. Prin ce se diferenţiază cele trei tipuri de testare: calitativă, cantitativă şi semicantitativă?
5. Dezvoltaţi un protocol sumar de detecţie cantitativă a acidului salicilic, împreună cu necesarul de reactivi şi echipamente.
6. Menţionaţi posibile aplicaţii ale detecţiei rapide a acidului salicilic.

Biosinteza penicilinei în cultură de *Penicillium* sp.

Activităţi şi competenţe:
- Etapele cercetării şi dezvoltării medicamentelor. Procesarea în amonte
- Izolarea unor tulpini pure de *Penicillium rubens* (anterior *P. chrysogenum*)
- Cultivarea fungilor în vederea obţinerii penicilinei
- Controlul şi reglarea biosintezei

Principiul lucrării

Diferite tulpini ale unor micromicete precum cele din genurile *Penicillium* (*Penicillium rubens*), *Acremonium* (*Acremonium chrysogenum*), *Aspergillus* (*Aspergillus nidulans*) şi altele, sunt capabile să producă diferiţi compuşi cu valoare antibiotică. Natura microorganismului producător, condiţiile de cultură şi prezenţa în mediul de cultură a unor precursori determină structura şi proprietăţile antibioticului produs. Condiţia primordială este de a avea o tulpină valoroasă a microorganismului producător.

Antibiotice beta-lactamice naturale şi semisintetice. Caracteristicile biosintezei

Antibioticele beta-lactamice includ peniciline, cefalosporine şi carbapeneme, acestea primind denumirea de la structura caracteristică, inelul β-lactam (Figura 5). Gruparea β-lactam este o structură formată din patru atomi (unul de azot şi trei de carbon) ce se întâlneşte foarte rar în natură, în afara grupului de antibiotice (Muntean, 2013).

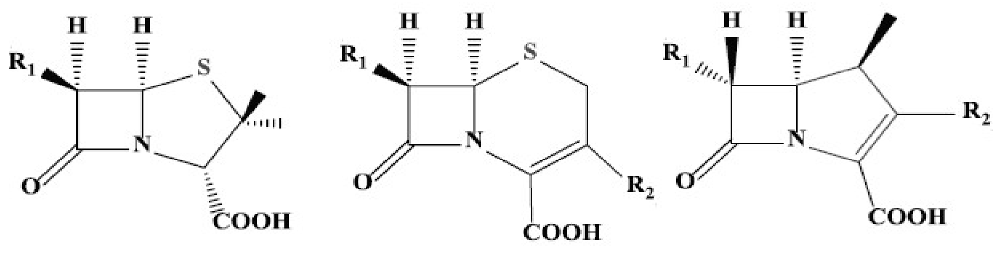
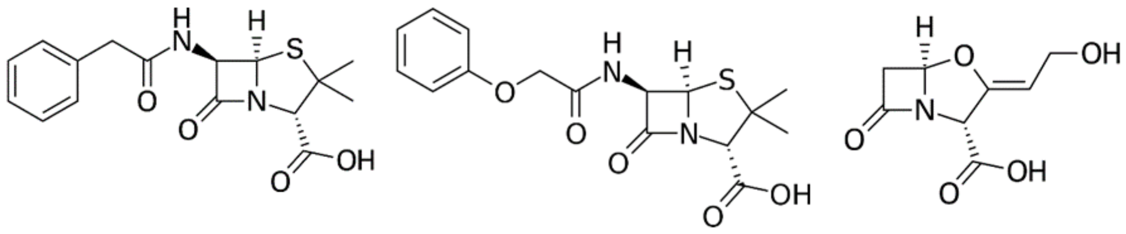


Figura 5. Similarităţi structurale ale antibioticelor beta-lactamice

Penicilinele au denumirea de la structura caracteristică, acidul 6-aminopenicilanic (6-APA), ce constă dintr-un inel β-lactam şi un inel tiazolidinic. La 6-APA, în poziţia 6, este ataşată o catenă variabilă (R1). Există numeroase peniciline naturale (G, K, O, X, F, V), care diferă prin natura radicalului de care se leagă inelul β-lactam. Această grupare conferă denumirea antibioticului: benzilpenicilina (penicilina G), fenoximetilpenicilina (penicilina V) etc. Dintre cele uzuale în terapia bolilor infecţioase, numai penicilina G, penicilina V şi acidul clavulanic sunt molecule naturale. Structural, acidul clavulanic este un clavam ce conţine inelul β-lactam fuzionat cu un inel oxazolidinic (conţine în poziţia 4 un atom de oxigen în locul sulfului) (Figura 6). Activitatea penicilinelor se exprimă în unităţi internaţionale (U.I.) şi este influenţată de structura moleculei, respectiv a radicalului (Tabelul 1) (Farkas, 2021).



Penicilina G Penicilina V Acidul clavulanic

Figura 6. Structura unor peniciline naturale

Tabelul 1. Structura şi activitatea penicilinelor (după Farkas, 2021)

Denumirea penicilinei	Structura radicalului	Denumirea radicalului	Activitatea [U.I./mg]
Penicilina G	$C_6H_5-CH_2-$	Benzil	1.667
Penicilina F	$CH_3-CH_2-CH=CH-CH_2-$	2-pentenil	1.500
Dihidropenicilina F	$CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$	2-pentil	1.670
Penicilina K	$CH_3-(CH_2)_5-CH_2-$	*n*-heptil	2.300
Penicilina V	$C_6H_5-O-CH_2-$	Fenoximetil	1.630
Penicilina X	$HO-C_6H_4-CH_2-$	*p*-hidroxi-benzil	900
Penicilina O	$CH_2=CH-CH_2-S-CH_2-$	Alilmercoptometil	-
Penicilina S	$CH_3-CCl=CH-CH_2-S-CH_2-$	3-clor-2-buteniltiometil	-

Antibioticele beta-lactamice naturale sunt produse de specii de fungi sau bacterii. Tulpini de *Penicillium rubens, Aspergillus nidulans, A. oryzae* produc peniciline, iar cele de *Acremonium chrysogenum* produc cefalosporina C. Actinobacteriile din genul *Streptomyces* produc penicilina N, iar *S. clavuligerus* este utilizată în biosinteza cefamicinei C şi a acidului clavulanic. Consacrate pentru producerea penicilinei G sunt suşe precum *P. rubens* Biourge (1923) sau ATCC 9478 (fostă *P. chrysogenum*, fostă *P. notatum*), izolată de Alexander Fleming, ori tulpinile superproducătoare utilizate în producţia industrială: *P. rubens* NRRL 1951, *P. rubens* Wisconsin 54-1255 sau ATCC 28089, *P. rubens* P2, *P. rubens* AS-P-78 (foste *P. chrysogenum*) (Houbraken şi colab., 2020; Martin, 2020; Fierro şi colab., 2022). Conform *International Commission of Penicillium and Aspergillus* (http://www.aspergilluspenicillium.org), genul *Penicillium* cuprinde în prezent 535 de specii, descrise şi acceptate (Visagie şi colab., 2014; 2020). Tulpinile consacrate producătoare de penicilină anterior clasificate ca *P. notatum* şi *P. chrysogenum* au fost recent reidentificate ca *P. rubens* (Houbraken şi colab., 2011), însă denumirea de *P. chrysogenum* încă se păstrează de către furnizorii de tulpini standard pentru biotehnologiile farmaceutice. Unele tulpini au suferit multiple reclasificări de-a lungul timpului. Spre exemplu, cea izolată de Fleming, prezumptiv descrisă ca *P. rubrum*, a fost identificată de micologul Charles Thom ca *P. notatum* Westling şi reclasificată ulterior *P. rubens* Biourge (1923), codificată de *American Type Culture Collection* ca ATCC 9478.

În biosinteza industrială, prepararea inoculului micelian pleacă de la suspensie de spori sau spori liofilizaţi, iar inoculul reprezintă 5 – 10% din volumul mediului de fermentaţie. Tulpina de micromicet se cultivă, în condiţii aseptice, în mediul de cultură conţinând drept sursă de carbon glucoza, melasa de sfeclă sau lactoza. Ca sursă de azot se adaugă must de cereale ce conţine β-feniletilamină. Se pot suplimenta precursori ai lanţurilor laterale precum acidul fenilacetic sau

fenilacetamida, care trebuie menţinuţi la un nivel constant şi destul de scăzut.Spre sfârşitul perioadei de fermentaţie sursa de azot se epuizează, aşa încât trebuie suplimentată. De regulă, sursa de carbohidraţi se adaugă intermitent, cu excepţia lactozei. Mediul de cultură se menţine la un pH de 6,3, favorabil fermentaţiei. La începutul procesului, pH-ul este 7, apoi scade la 3, astfel că mediul se tamponează permanent cu NaOH pentru asigurarea unui pH optim.Temperatura de fermentaţie se menţine la valori de aproximativ 25°C. Productivitatea este mai mare dacă temperatura se reglează după faza de creştere: 30-32°C pentru trofofază şi 24°C pentru idiofază. Agitarea puternică menţine componentele mediului în suspensie şi asigură concentraţia oxigenului dizolvat necesar mucegaiului, foarte aerob. Penicilinele şi cefalosporinele naturale sunt derivate din molecule asamblate în sistem modular, fiind peptide sintetizate non-ribosomal. Biosinteza se bazează pe condensarea a trei aminoacizi: acidul L-α-aminoadipic, L-cisteina şi L-valina. Sinteza penicilinei este supusă mecanismului reglării prin feedback al sintezei metaboliţilor primari. Deşi penicilina este un metabolit secundar, obţinerea sa este influenţată de metaboliţii primari, precursori ai biosintezei. Aminoacizii proteinogeni (izomeri L) precum valina și lizina în exces exercită o acţiune inhibitorie a activităţii enzimelor lanţului de biosinteză (Farkas, 2021). Biosinteza penicilinei este inhibată de prezenţa unor glucide (glucoză, zaharoză), accentuată de fosfaţii anorganici, iar odată instalată represia de catabolit, aceasta nu este inactivată de reglarea pH-ului spre domeniul alcalin. Exprimarea genelor din clusterul biosintezei penicilinei este dependentă de disponibilitatea sursei de azot, dar represată de un nivel ridicat al ionilor de amoniu (Martin și colab., 1999; Brakhage și colab., 2004).

ACTIVITATE EXPERIMENTALĂ

Necesar pentru testarea a 4 tulpini fungice

• Plăci Petri cu mediul de cultură lactoză peptonă agar / Czapek-Dox agar (4 buc)
• Flacoane cu câte 100 ml mediu de cultură lichid pentru biosinteza penicilinei (4 buc)
• Extract de porumb (50 ml)
• Soluţie de glucoză 5,5% (25 ml)
• Seringă sterilă și filtre sterilizante cu porozitate 0,2 µm (Minisart)
• Pahare Erlenmeyer 100 ml și 250 ml
• Baloane cu fund plat 250 ml (4 buc)
• Cilindri gradaţi 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml
• Tulpini de micromicete sau fructe (citrice) şi pâine alterată
• Tulpini de *P. rubens* din surse naturale diverse (pâine, fructe) și o tulpină de referinţă (ATCC 9478, ATCC 28089 sau o tulpină superproducătoare utilizată industrial)
• Pipete, vârfuri, pipete Pasteur, anse, pensetă
• Pix marker permanent
• Echipament de laborator: balanţe, pH-metru, agitator cu încălzire, vortex, incubator, etuvă, autoclav sterilizare, autoclav decontaminare, frigider reactivi, frigider tulpini, hotă microbiologică, lămpi UV, bec de gaz

Mod de lucru

1. ***Prepararea mediilor de cultură și a soluţiilor***

Atenţie: Reţetele mediilor de cultură prevăd cantităţile necesare pentru prepararea unui volum final de 1 litru. Se vor ajusta cantităţile raportat la volumul preparat!

- Se cântăresc 10g făină de porumb și se macerează în 100 ml apă rece timp de 30 minute, după care se prelevează extractul apos şi se autoclavează timp de 15 minute la 121°C;

- Se prepară 100 ml mediu agarizat prin dizolvarea ingredientelor la cald. Pentru mediul cu lactoză-peptonă se ajustează pH-ul la 6,5 ± 0,2 și se autoclavează 15 minute la 121°C. Pentru mediul Czapek Dox se ajustează pH-ul la 6 ± 0,2 și se autoclavează 20 de minute la 115°C;

- Se prepară 4 x 100 ml mediu de cultură lichid prin dizolvarea ingredientelor la cald, se ajustează pH-ul la 7 ± 0,2 și se autoclavează 15 minute la 121°C;

- Se prepară soluția de glucoză și se sterilizează prin filtrare sterilizantă;

- Se toarnă mediul agarizat sterilizat în cutii Petri sterile sub hota microbiologică;

- În fiecare balon conţinând bulion lactozat se adaugă câte 2 ml soluţie glucoză şi 10 ml extract de porumb, în condiţii sterile, înainte de inoculare.

Compoziţia mediului lactoză peptonă agar

Agar ....15 g
Lactoză ....0,5 g
Peptonă ....0,5 g
Apă distilată..1 l

Compoziţia mediului Czapek Dox agar

Zaharoză ....30 g
$NaNO_3$ ....3 g
K_2HPO_4 ....1 g
$MgSO_4 \times 7H_2O$ ....0,5 g
KCl ....0,5 g
$FeSO_4$..0,01 g
Agar ....15 g
Apă distilată..1 l

Compoziţia mediului bulion pentru biosinteza penicilinei

Lactoză ....44 g
$NaNO_3$ ....3 g
$MgSO_4$ ....0,25 g
KH_2PO_4 ....0,5 g
$ZnSO_4$ ....0,044 g
$MnSO_4$ ....0,044 g
Apă distilată..1 l

Soluţie de glucoză 5,5% (pentru 4 x 100 ml mediu de cultură)

Glucoză...2,2 g
Apă distilată..40 ml

Extract de porumb (pentru 4 x 100 ml mediu de cultură)

Făină de porumb ....10 g
Apă distilată..100 ml

2. *Obţinerea penicilinei în mediul de cultură*

- Se izolează pe plăcile cu mediul lactoză peptonă agar/Czapek Dox agar tulpini pure de *Penicillium rubens* și alte micromicete din diverse surse (fructe, pâine);

- Se obţin prin propagare 3-4 culturi pure, de preferinţă tulpini provenite din surse diferite, pentru a evalua comparativ capacitatea acestora de a produce compuși cu valoare antibiotică. Se va lua în considerare faptul că dezvoltarea miceliilor poate necesita o perioadă de 14 zile!

- Înainte de inoculare, se suplimentează câte 2 ml soluţie glucoză și 10 ml extract apos de porumb în fiecare flacon;

- Se inoculează cele patru flacoane cu bulion cu 5-10% volum de inocul din fiecare cultură pură selectată. Un flacon se inoculează cu tulpina de referinţă;

- Se incubează flacoanele în scopul biosintezei, în primele 24 de ore la 30°C și apoi timp de 6-13 zile la 24°C. La fiecare 2-3 zile se suplimentează cu câte 2 ml soluţie glucoză în fiecare flacon. Biosinteza se realizează în incubator cu agitare continuă la 200 rpm sau în camera termostatată. Dacă incubarea se realizează în condiţii statice, se agită zilnic conţinutul flacoanelor pentru aerare şi stimularea fermentaţiei;

- Se verifică periodic pH-ul şi se corectează la valoarea de 6,3;

- Spre finalul biosintezei (în ziua 5 pentru biosinteza de 7 zile sau în ziua 10 pentru biosinteza de 14 zile) se suplimentează fiecare flacon cu 5 ml extract apos de porumb.

Întrebări și exerciţii

1. Identificaţi tipul de bioproces, componentele sale și etapele procesării în amonte în biosinteza penicilinei.
2. Acidul clavulanic diferă de antibioticele beta-lactamice convenţionale ca structură și tip de biosinteză. Ce tip de antibiotic este acesta și de cine este produs? Ce fenomen declanșează legarea covalentă a acestuia de restul de serină al beta-lactamazei?
3. Structura catenei variabile (radicalul) determină activitatea antimicrobiană a antibioticului. Ce alte proprietăţi ale moleculei mai influenţează? Poate un radical să influenţeze similar antibiotice din clase diferite?
4. Identificaţi produșii intermediari și enzimele biosintezei penicilinei G.
5. Ce este represia prin catabolit și cum este prevenit acest fenomen în decursul biosintezei penicilinei?
6. Care este raţionamentul suplimentării mediului de cultură cu extract de porumb?
7. În ce etapă de creștere a culturii se sintetizează penicilina și de ce? Argumentaţi condiţiile optime ale derulării biosintezei și identificaţi cauzele încetării producerii de penicilină de către miceliul de *Penicillium rubens*.
8. Accesaţi linkul de mai jos și urmăriţi protocolul dezvoltat de Greule și colab. (2017). Identificaţi asemănările și deosebirile dintre metodele prezentate și cele utilizate de noi în laborator. Imaginaţi variante pentru continuarea experimentului nostru. https://www.jove.com/v/54952/from-a-natural-product-to-its-biosynthetic-gene-cluster-a-demonstration-using-polyketomycin-from-streptomyces-diastatochromogenes-t%C3%BC6028

Extracţia antibioticelor produse pe cale biotehnologică

Activităţi şi competenţe:
- Bioprocese cu implicaţii în industria farmaceutică. Procesarea în aval
- Extracţia penicilinei din mediul de cultură prin separare lichid-lichid
- Identificarea factorilor ce influenţează randamentul extracţiei
- Puritatea substanţei medicamentoase. Conformitatea loturilor. Dosarul farmaceutic

Principiul lucrării

Penicilina obţinută prin biosinteză cu ajutorul unor tulpini de micromicete se extrage cu ajutorul unui solvent organic și se cristalizează sub formă de penicilinat de potasiu. Condiţiile de temperatură și pH la care se execută operaţiile influenţează gradul de recuperare al antibioticului.

Extracţia antibioticelor din mediul de cultură

În cazul multor antibiotice, producţia prin biosinteză generează un complex antibiotic format din componente distincte cu structură asemănătoare, o componentă majoră şi diferiţi congeneri. În cazul penicilinelor, microorganismul producător și prezenţa unor precursori în mediul de cultură determină tipul de moleculă sintetizată. Pe lângă antibioticul de interes, mediul conţine numeroşi alţi produşi, iar extracţia se bazează pe solubilitatea, proprietăţile adsorbante şi ionice ale penicilinei, dar și pe stabilitatea moleculei. Extracţia se realizează într-o succesiune de etape:

• Mediul este transferat în tancuri pentru sedimentare şi clarificare, iar fermentaţia este oprită prin răcirea miceliului la 5-10°C, în paralel cu scăderea pH-ului la 6 şi adăugarea de formol 1-2% pentru a reduce contaminarea. Aceste măsuri sunt necesare deoarece penicilina este termolabilă şi foarte reactivă, fiind uşor distrusă la pH alcalin sau de către enzime;

• După deproteinizare prin adăugare de $CaCl_2$, mediul se filtrează sau se centrifughează. Miceliul separat se spală, iar lichidele de spălare se reunesc cu filtratul iniţial;

• Filtratul se prelucrează pentru obţinerea penicilinei: pH-ul se scade la 2 cu ajutorul acizilor minerali (acid clorhidric, acid sulfuric sau acid fosforic) pentru o perioadă scurtă, iar extracţia se realizează cu un volum mic de solvent organic (acetat sau amil sau de butil);

• Faza apoasă este separată de cea organică ce conţine penicilina prin centrifugare. Solventul este trecut printr-un strat de cărbune activ pentru îndepărtarea impurităţilor;

• Se re-extrage penicilina cu un tampon fosfat 2%, la pH 7,5. Soluţia tampon conţinând penicilina se acidifiază iar penicilina este din nou extrasă într-un volum mic de solvent organic, ajungându-se la concentrarea penicilinei de 80-100 de ori;

• Penicilinele sunt acizi carboxilici şi trebuie convertite în săruri stabile în vederea conservării. Penicilina G concentrată este convertită în penicilinat de Na sau K, respectiv procain penicilină (Farkas, 2021).

Reducerea numărului de operaţii tehnologice, scăderea cantitativă a deşeurilor şi îmbunătăţirea randamenului de obţinere a penicilinei, respectiv a acidului 6-aminopenicilanic (6-APA) ca precursor al antibioticelor semisintetice se pot îndeplini prin realizarea fermentaţiei în bioreactoare eficiente, continue, automatizate, dar şi prin îmbunătăţirea performanţelor extracţiei

utilizând tehnici de separare cu ajutorul acetatului de butil la pH scăzut (Aliwarga și colab., 2019), precum şi a utilizării filtrelor de cărbune activ în purificare. Aceste îmbunătăţiri conduc la o eficienţă a procesului de 90% şi un cost aproximativ de 20 $/kg de penicilină, comparativ cu metoda convenţională a cărei eficienţe este de 70%, iar costul penicilinei de aproximativ 350 $/kg de penicilină (Kundu și colab., 2019).

Unele peniciline precum ampicilina și amoxicilina sunt molecule cu caracter amfoter, având o grupare amino liberă și o grupare carboxil. Aceste peniciline semisintetice sunt obţinute prin acilarea enzimatică a 6-APA cu esteri de fenilglicină. Penicilinacilaza utilizată pentru cataliza enzimatică provine din variate surse microbiene, în special de la specii precum *Acetobacter pasteurianum, Bacillus megaterium, Escherichia coli, Pseudomonas melanogenum, Providentia rettgeri* și *Xanthomonas citrii* (Kerkhof și colab., 1998). Extracţia penicilinelor semisintetice se realizează în soluţie apoasă, din mediul de cultură, fără adaos de solvenţi organici. Condiţiile extracţiei și purificării din amestecul ce conţine 6-APA și ampicilină sunt dirijate în funcţie de proporţia celor două componente. Pentru precipitarea atât a ampicilinei cât și a precursorului 6-APA se operează la o temperatură cuprinsă între 0 și 25°C și un pH între 5,5 și 7,8. În practică, pH-ul optim este un compromis între puritatea ridicată și randamentul ampicilinei recuperate. Atunci când pH-ul este puţin scăzut sub 8, ampicilina cristalizează cu o puritate >90% dar parțial rămâne în mediu, iar 6-APA este complet în soluţie. Pe de altă parte, la un nivel mai scăzut de pH, ampicilina este aproape complet cristalizată, dar în acelaşi timp o parte din 6-APA este de asemenea precipitat. La un pH aflat în intervalul între 1 și 6 atât ampicilina cât și 6-APA cristalizează complet (Boesten și colab., 1996).

ACTIVITATE EXPERIMENTALĂ

Necesar pentru 4 flacoane de biosinteză cu câte 50 ml mediu de cultură

- Acetat de butil (40 ml)
- Soluţii pentru corectare pH
- Acetat de potasiu
- Pâlnii, hârtie de filtru
- Pâlnii de separare 100 ml sau 200 ml din sticlă, stative pâlnii
- Sticle de ceas sau cutii Petri din sticlă, sterile, pentru evaporare
- Seringi și filtre sterilizante cu porozitate 0,2 µm (Minisart)
- Microtuburi centrifugă (tuburi Eppendorf) 2 ml, sterile
- Apă distilată, gheaţă
- Pipete, vârfuri de pipetă
- Pix marker permanent
- Echipament de laborator: balanţe, pH-metru, nișă chimică

Mod de lucru

- Se verifică pH-ul mediului şi se corectează la valoarea de pH 6;
- Se agită mediul, se răceşte şi se filtreză sau se centrifughează, îndepărtându-se miceliul;
- Se răceşte filtratul pe baie de gheaţă la 1-2°C şi se reglează pH-ul filtratului la 2-2,5;
- Se transferă filtratul în pâlnia de separare, se adaugă 10 ml acetat de butil, se agită uşor şi se aşteaptă separarea fazelor (Figura 7);
- Se recuperează faza organică într-un recipient plasat în baie de apă cu gheaţă;

- Se repetă extracţia cu încă 10 ml acetat de butil (opţional);
- Se adaugă 0,1 g acetat de potasiu şi se amestecă;
- Se evaporă la rece acetatul de butil;
- Se cântăresc cristalele obţinute, care reprezintă Penicilină G sub formă de sare de potasiu şi acetat de potasiu.
- Se resuspendă penicilinatul de potasiu în apă distilată, se filtrează prin filtre sterilizante și se transferă în recipiente de stocare, păstrându-se la frigider.



Figura 7. Extracţia penicilinei din filtrat cu ajutorul acetatului de butil

Întrebări și exerciţii

1. Identificaţi etapele procesării în aval în obţinerea penicilinei. Extrapolaţi procesarea în aval de la producerea substanţelor medicamentoase de tipul moleculelor mici către producerea biofarmaceuticelor de tipul proteinelor recombinate. Analizaţi comparativ riscul de variabilitate în randamentul de obţinere a substanţei medicamentoase și a acţiunii terapeutice între loturi.
2. Ce proprietăţi are penicilina, conferite de structura moleculei?
3. Care sunt cele două faze de separare în extracţia penicilinei și în care dintre ele se găsește penicilina?
4. De ce se utilizează acetatul de butil pentru extracţia penicilinei? De ce este de preferat să nu se utilizeze solvenţi organici pentru extracţia ampicilinei?
5. De ce se operează extracţia la temperaturi scăzute și de ce nu se utilizează evaporarea la cald a solventului?
6. De ce se operează la diferite valori ale pH-ului în decursul extracţiei?
7. Ce metode suplimentare trebuie aplicate în scopul purificării pentru a obţine antibiotice de grad farmaceutic?
8. Să ne imaginăm că faceţi parte din echipa de cercetare-dezvoltare a unui nou antibiotic aflat în etapa de testare preclinică. Ce informaţii va conţine dosarul farmaceutic pe care îl veţi întocmi?

Evaluarea efectului antimicroban al compuşilor obţinuţi prin biosinteză

Activităţi și competenţe:
- Dezvoltarea metodelor de analiză pentru evaluarea compușilor de biosinteză
- Metode convenţionale și screening cu randament sporit
- Susceptibilitatea la antibiotice. Rezistenţa, rezilienţa și biofilmul bacterian
- Selecţia compușilor candidat

Principiul lucrării

Compușii obţinuţi prin biosinteză cu ajutorul unor tulpini de micromicete au un potenţial efect antimicrobian, ce poate fi evaluat atât în medii agarizate (metoda antibiogramei) cât și în medii lichide (metoda screeningului cu randament sporit). Susceptibilitatea la antibiotice este împiedicată de biofilmul bacterian. Dezvoltarea unor metode adecvate de analiză și execuţia corectă a protocoalelor experimentale vor conduce la rezultate fiabile în vederea selecţiei compușilor candidat.

Dezvoltarea și testarea compușilor cu potenţial antimicrobian

Omenirea se confruntă cu o cerere din ce în ce mai mare de noi agenţi antimicrobieni pentru a rezolva criza globală generată de microorganismele multirezistente. Se estimează că cel puțin 700.000 de persoane mor în fiecare an din cauza infecțiilor cu bacterii rezistente la antibiotice, iar decesele ar putea ajunge la 10 milioane anual până în 2050 dacă problema nu va fi abordată corespunzător (Miethke și colab., 2021). Este mare nevoie de strategii inovatoare și de noi molecule capabile de mecanisme de acțiune diferite de cele existente, pentru a aborda fenomenul de rezistență. Descoperirea și dezvoltarea de noi antibiotice se confruntă cu multiple limitări din sectoarele de cercetare și finanțare, fiind esenţială o expertiză interdisciplinară.

În cadrul procesului de descoperire a medicamentului, etapele cheie ale testării preclinice implică identificarea și validarea inițială a țintei, dezvoltarea testelor, screeningul cu randament ridicat, identificarea și optimizarea compușilor promiţători și, în final, selectarea unei molecule candidat pentru dezvoltarea clinică. Selecţia metodelor de testare a compușilor trebuie să ţină cont de următorii factori:

- Relevanţa farmacologică a metodei de analiză, întrucât metoda trebuie să fie adecvată pentru identificarea compușilor cu mecanismul de acţiune terapeutică dorit;
- Reproductibilitatea metodei de analiză, întrucât programele de testare pot dura ani de zile;
- Costurile cu analiza, întrucât consumul de materiale și reactivi pot fi diminuate prin selecţia unor metode de screening cu randament sporit;
- Calitatea rezultatelor (parametrii de performanţă ai metodei: limita de detecţie, limitele domeniului de măsurare, precizia în condiţii de repetabilitate și reproductibilitate, exactitatea, incertitudinea de măsurare în ceea ce privește robusteţea, sensibilitatea și specificitatea metodei);
- Efectul compușilor ce intervin în testare, întrucât unele substanţe pot genera rezultate fals negative sau fals pozitive (Hughes și colab., 2011).

Biosinteza microbiană și produsele naturale constituie în continuare surse importante de noi medicamente antiinfecţioase, iar proiectarea și implementarea unor metode adecvate de testare a

efectului antibacterian sunt esenţiale pentru evaluarea compuşilor şi extractelor. O serie de metodologii utilizate implică testări fenotipice (difuzia cu discuri în medii agarizate, difuzia cu decupaje în agar, diluţiile în medii lichide, testele radiorespirometrice, metodele pe bază de coloranți și teste de fluorescenţă/luminiscenţă), moleculare (genetică, genomică, transcriptomică) și spectrometria de masă. Este important ca metodele de testare in vitro să fie adecvate și armonizate pentru determinarea activității biologice, dar în același timp să ofere rapiditate, fiabilitate și randament crescut. Cele două organizaţii importante care furnizează ghiduri şi seturi de recomandări, stabilind şi armonizând criteriile de interpretare în ceea ce priveşte testarea susceptibilităţii antimicrobiene sunt *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (www.eucast.org) şi *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) din SUA (www.clsi.org). Două metode consacrate sunt în prezent standardizate pentru laboratorul clinic, în scopul determinării eficienţei terapeutice a antibioticelor și pentru supravegherea fenomenului de rezistenţă. Metoda semicantitativă Kirby-Bauer sau difuzia cu discuri este utilizată în mod curent pentru a desemna antibioticul cel mai eficient împotriva unui anumit agent patogen bacterian (Farkas, 2016; EUCAST, 2024a). Metoda cantitativă este cea a concentraţiei minime inhibitorii (CMI), utilizată pentru a determina concentrația minimă de antibiotic necesar pentru a ucide agentul patogen la locul infecției. Metodele de referinţă au fost recent standardizate internaţional în vederea testării activităţii compușilor antimicrobieni (ISO 20776-1:2019; ISO 20776-2:2021).

Expunerea prelungită a bacteriilor la concentraţii subinhibitorii ale agenţilor antimicrobieni poate induce un mecanism adaptativ de rezilienţă denumit hormeză (Farkas și colab., 2014). Efectele hormetice rezidă în intensificarea metabolismului, creşterii, motilităţii, a capacităţii de a produce biofilm, dar și a frecvenței mutațiilor și transferului conjugativ al plasmidelor (Iavicoli și colab., 2021). Acumularea de mutaţii și achiziţia unor gene ce codifică mecanisme de rezistenţă fac ca antibioticele consacrate să nu mai poată inactiva o serie de tulpini bacteriene. În plus, eradicarea infecţiilor ce implică tulpini formatoare de biofilm este deosebit de dificilă, terapia cu agenţi antimicrobieni administraţi în dozele uzuale fiind adesea ineficientă. Biofilmul reprezintă un hotspot pentru apariţia și răspândirea fenomenului de rezistență la antibiotice datorită densităţii mari a populației și proximității celulelor, ceea ce determină o rată ridicată a transferului lateral de gene (Balcázar și colab., 2015). Rezistenţa şi rezilienţa biofilmului este un fenomen multifactorial ce rezidă în mecanisme complexe:

- Reducerea penetrării și sechestrarea agenţilor antimicrobieni în biofilm datorită matricii exopolizaharidice;
- Comunicarea intercelulară prin quorum sensing și reglarea proceselor celulare prin modificarea exprimării genice;
- Activarea mecanismelor de răspuns la stres (pompe de eflux, producerea de enzime);
- Crearea unor micronișe cu potenţial redox modificat, unde pot fi active diferite tipuri metabolice de microorganisme;
- Reducerea metabolismului și prezenţa celulelor persister, celule specializate în supravieţuire, tolerante la antibiotice, ce pot redeveni active fiziologic (Chambless și colab., 2004; Sionov și Steinberg, 2022).

În cazul biofilmelor medicale, celulele persister și implicit infecţiile cronice și recidivante reprezintă o mare provocare pentru succesul terapiilor antiinfecţioase (Niu și colab., 2024). Este esenţială dezvoltarea de noi clase de antibiotice, capabile de noi mecanisme de acţiune, care să

eludeze rezistenţa şi rezilienţa bacteriană, să fie eficiente în cazul patogenilor multirezistenţi, să acţioneze la nivelul biofilmului inhibând formarea acestuia, să împiedice diferenţierea celulelor persister și să le anihileze.

Pentru a investiga efectul noilor compuși antimicrobieni asupra biofilmului bacterian, testarea ţintește atât stadiile incipiente ale adeziunii bacteriene și formării biofilmului, cât și biofilmul matur. Portofoliul de metode este unul extrem de variat, implicând tehnici specifice microbiologiei convenţionale prin cultivare urmată de inocularea diluţiilor succesive și numărarea unităților formatoare de colonii, de colorare a biomasei și spectrofotometrie, de vizualizare microscopică directă sau în fluorescenţă, tehnici moleculare precum hibridizarea ADN cu sonde marcate chimic sau fluorescent (FISH) sau analizele microarray, până la metode de examinare detaliată a arhitecturii tridimensionale a biofilmului prin microscopie confocală (CLSM). În dezvoltarea farmaceutică, o serie de teste au fost adaptate pentru a evalua eficienţa moleculelor candidat asupra bacteriilor viabile, dar necultivabile (VBNC) și a consolida compușii eficienţi împotriva celulelor persister (Niu și colab., 2024). Cuantificarea biofilmului în microplăci este o metodă utilă pentru evaluarea atașării bacteriene prin măsurarea colorării biomasei aderente. Utilizarea plăcilor cu 96 de godeuri este adecvată ca instrument pentru screeningul cu randament sporit (număr mare de tulpini sau specii bacteriene, număr mare de compuși de interes). Metoda colorării cu soluţie de cristal-violet este consacrată pentru cuantificarea biomasei (Meritt și colab., 2005; O'Toole, 2011), iar utilizarea clorurii de trifenil tetrazoliu, a resazurinei sau indicatorului roșu fenol (Welch și colab., 2012; Skogman și colab., 2016; Haney și colab., 2018) permit analiza viabilității celulare.

ACTIVITATE EXPERIMENTALĂ

Necesar

• Mediu de cultură Mueller Hinton agar (10 cutii Petri)
• Mediu de cultură bulion Mueller Hinton sau bulion peptonat (20 ml)
• 10 tulpini bacteriene*, culturi proaspete (de 24 de ore) pe mediu agarizat
• 10 eprubete mici (10 x 100 mm) cu ser fiziologic (tuburi de hemoliză cu câte 3 ml ser)
• 10 eprubete mari (18 x 180 mm) cu câte 20 ml ser
• Ser fiziologic pentru completare (5 eprubete mari cu câte 20 ml ser)
• Etalon de turbiditate 0,5 McFarland (sau clorură de bariu și acid sulfuric pentru prepararea etaloanelor de turbiditate)
• Soluţie cristal violet 0,1% (20 ml)
• Etanol sau metanol 95% (20 ml)
• Extrasele de complex antibiotic/penicilină obţinute la lucrările anterioare, soluţii stoc sterilizate prin filtrare
• Soluţie de penicilină G standard sau discuri impregnate cu penicilină G sau ampicilină
• Rondele din hârtie de filtru groasă cu diametrul de 5 mm, sterile
• Tampoane de vată sterile pentru inoculare
• Sticlărie de laborator: flacoane 50, 100 și 250 ml, cilindri gradaţi 50, 100 și 250 ml, eprubete 10 x 10 mm și 18 x 180 mm
• Cutii Petri sterile
• Microplăci cu 96 godeuri, sterile
• Pipete, vârfuri pipetă

• Anse
• Apă distilată sterilă
• Pix marker permanent
• Echipament de laborator: balanţe, pH-metru, agitator cu încălzire, cuptor cu microunde, vortex, incubator, etuvă, autoclav sterilizare, autoclav decontaminare, frigider reactivi, frigider tulpini, hotă microbiologică, lămpi UV, bec de gaz

*Se vor folosi tulpini de referinţă *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *B. subtilis* ATCC 12695, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 și/sau alte tulpini disponibile în laborator, precum *Acinetobacter baumanii*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus*, *Sarcina* sp., *Serratia* sp. sau altele, în funcţie de disponibilitate. Se vor include în testare atât bacterii Gram-negative cât și Gram-pozitive. Tulpinile din laborator trebuie să fi fost identificate biochimic sau molecular în prealabil.

Mod de lucru

1. Prepararea soluţiilor stoc de antibiotice brute

Se realizează prin cântărirea cristalelor de penicilinat de K sau penicilinat de Na, resuspendarea într-un volum de apă distilată pentru obţinerea unei concentraţii cunoscute, filtrarea prin membrane filtrante sterilizante cu porozitate de 0,2 µm și transferul în tuburi de microcentrifugă sterile. Soluţiile stoc se păstrează la frigider.

2. Prepararea etalonului de turbiditate 0,5 McFarland

Etalonul de turbiditate 0,5 McFarland este necesar pentru pregătirea inoculului bacterian. Această densitate corespunde unei concentraţii de aproximativ $1 – 2 \times 10^8$ celule/ml pentru *E. coli*. Dacă laboratorul nu dispune de etaloane de turbiditate standardizate, acestea se prepară înainte de începerea testării, utilizând două soluţii stoc:

- Soluţie stoc $BaCl_2$ 0,048 mol/l (1,175% $BaCl_2 \times 2H_2O$) – 10 ml (se păstrează);
- Soluţie stoc H_2SO_4 0,18 mol/l (1%) – 50 ml (se păstrează).

Mod de preparare și stocare:

- Se adaugă 50 µl soluţie stoc $BaCl_2$ 1,175% la 995 µl soluţie stoc H_2SO_4 1%;
- Se omogenizează suspensia şi se verifică spectrofotometric absorbanţa la 625 nm, astfel încât să se încadreze în intervalul 0,08 şi 0,13;
- Se distribuie suspensia omogenizată în eprubete de aceeaşi dimensiune ca şi cele cu ser folosite pentru prepararea inoculului;
- Etaloanele de turbiditate, închise ermetic, se stochează la temperatura camerei, la întuneric, pe o perioadă de până la 6 luni;
- Se vortexează înainte de fiecare utilizare;
- Se verifică periodic absorbanţa etaloanelor de turbiditate.

3. Prepararea mediilor de cultură și a soluţiilor

Atenţie: Reţetele mediilor de cultură prevăd cantităţile necesare pentru prepararea unui volum final de 1 litru. Concentraţia soluţiilor se exprimă procentual. Se vor ajusta cantităţile raportat la volumul preparat!

- Dacă se utilizează medii preformulate, acestea se cântăresc şi se sterilizează conform indicaţiilor producătorului;
- Pentru mediul Mueller Hinton agar, Oxoid, granule deshidratate, se utilizează 38 g/l. Se prepară mediul de cultură prin dizolvarea ingredientelor la cald, se ajustează pH-ul la valoarea 7,3 ± 0,1. Se autoclavează timp de 15 minute la 121°C și se toarnă în cutii Petri sterile;
- Pentru mediul Mueller Hinton broth, Oxoid, pulbere deshidratată, se folosesc 21 g/l iar pentru bulionul peptonat (Tryptic Soy Broth, Oxoid) se utilizează 30 g/l. Se prepară mediul de cultură prin dizolvarea ingredientelor la cald, se ajustează pH-ul la valoarea 7,3 ± 0,1. Se autoclavează timp de 15 minute la 121°C;
- Se prepară o cantitate suficientă de ser fiziologic (300 ml) și se distribuie în eprubete, conform specificaţiilor din necesar. Se sterilizează prin autoclavare timp de 15 minute la 121°C;
- Se prepară soluţia de cristal violet și se păstrează în recipient închis ermetic, la temperatura camerei.

Compoziţia mediului Mueller Hinton agar

Infuzie de carne ....300 g
Hidrolizat de cazeină..17,5 g
Amidon...1,5 g
Agar..17 g
Apă distilată..1 l

Compoziţia mediului bulion Mueller Hinton

Infuzie de carne ....300 g
Hidrolizat de cazeină..17,5 g
Amidon...1,5 g
Apă distilată..1 l

Compoziţia mediului bulion peptonat

Hidrolizat enzimatic de cazeină ....17 g
Hidrolizat enzimatic de soia..............................3 g
NaCl..5 g
Glucoză..2,5 g
K_2HPO_4 ....2,5 g
Apă distilată..1 l

Ser fiziologic (8,5% sare)

NaCl..8,5 g
Apă distilată..100 ml

Soluţie cristal violet 0,1%

Cristal violet ....0,1 g
Apă distilată..100 ml

Metoda I – Evaluarea efectului antimicrobian prin metoda difuziei cu discuri

Pregătirea și inocularea plăcilor

- Numărul replicatelor se stabileşte în prealabil pentru fiecare experiment;

- Plăcile cu mediu agarizat și eprubetele cu ser pregătite în prealabil și păstrate la frigider se preîncălzesc în incubator la 37°C;

- Se trasează cadrane pe dosul fiecărei plăci Petri, cu ajutorul unui marker fin, notându-se simbolul agentului antimicrobian de testat în fiecare cadran și concentraţia testată;

- Se notează pe capacul fiecărei plăci tulpina de inoculat, respectiv grupul de lucru, şi se datează;

- Se notează eprubetele cu ser fiziologic cu simbolul tulpinii;

- Se prepară inoculul bacterian prin prelevarea unei mici cantităţi din cultura pură de 24 de ore şi suspendarea acesteia în ser; se vortexează; se aduce suspensia la o turbiditate de 0,5 McFarland, prin comparaţie vizuală cu etalonul de turbiditate; se utilizează cardul special pentru comparaţia vizuală;

- Se inoculează fiecare placă Petri conţinând mediul agarizat cu o tulpină bacteriană, prin repartizarea uniformă pe toată suprafaţa, cu ajutorul unui inoculator cu tampon de vată steril;

- Se plasează pe mediul de cultură inoculat, în centrul fiecărui cadran, o rondea din hârtie de filtru sterilă pe care se pipetează 10-20 µl soluţie de antibiotic, conform codificării prealabile;

- Se plasează în centrul fiecărei plăci câte un disc impregnat cu antibiotic standard (de preferat penicilină G, ampicilină, sau un alt antibiotic din clasa beta-lactamicelor);

- Se incubează plăcile la 36°C timp de 16-20 de ore;

- Se urmăreşte respectarea regulii 15-15-15: fiecare interval de timp, de la prepararea suspensiei bacteriene până la inoculare, de la inoculare până la plasarea discurilor cu agenţi antimicrobieni şi de la finalizarea plăcii până la introducerea în incubator să nu depăşească 15 minute;

Citirea plăcilor și interpretarea rezultatelor

- După incubarea timp de 16-20 de ore se evaluează efectul antimicrobian prin măsurarea zonei de inhibiţie cu ajutorul unei rigle gradate, pe dosul plăcii, în lumină transmisă, pe un fundal negru (Figura 8);

- Se notează diametrul zonei de inhibiţie pentru fiecare compus și pentru antibioticul de referinţă;

- Se interpretează rezultatele, analizând prin comparaţie valorile ghidului EUCAST (EUCAST, 2024b).

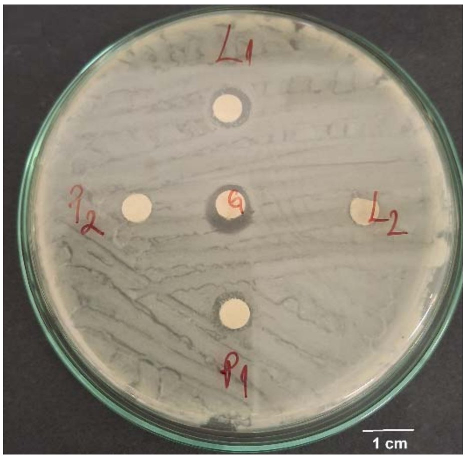


Figura 8. Antibiograma unei tulpini de *S. aureus* testată cu patru extracte brute de penicilină (L1, L2, P1, P2) și o soluţie de penicilină G standard (G).

Metoda II - Evaluarea efectului antimicrobian prin metoda microdiluţiilor

Pregătirea și inocularea microplăcilor

Numărul replicatelor și schema microplăcilor se stabilesc în prealabil, pentru fiecare experiment. Pentru testarea efectului antimicrobian se pregătesc microplăcile cu mediu de cultură. Se vor pipeta câte 90 sau 100 µl mediu de cultură în fiecare godeu, conform unei scheme predefinite precum cea din Figura 9, care prevede testarea a patru extrase asupra a 10 tulpini bacteriene. Această schemă este descrisă în prezentul protocol.

Notă: Schema se poate reconfigura și, prin simpla inversare a plăcii, se vor putea testa 8 extrase (sau 4 extrase, fiecare în două concentraţii) asupra a 6 tulpini (Figura 10). Pentru identificarea CMI, se scade progresiv cantitatea de mediu de cultură pentru a dubla concentraţia de antibiotic în fiecare rând, conform unei scheme predefinite. Pentru godeurile unde cantitatea de mediu este sub 60 µl, iar cea de soluţie de antibiotice peste 40 µl, este necesară utilizarea bulionului dublu concentrat;

- Pe fiecare placă se prevede o coloană cu godeuri pentru martorii negativi (mediu de cultură și respectiv mediu de cultură suplimentat cu soluţie de antibiotic, dar fără inocul bacterian (în coloanele 1 și 12 se vor repartiza câte 100 µl bulion steril în fiecare godeu);

- Coloanele 2-11: se vor repartiza câte 90 µl bulion steril în fiecare godeu;

- Rândurile D-G: se adaugă extract de antibiotic obţinut prin biosinteză în laborator (rândul B – penicilina 1, rândul C – penicilina 2 etc.);

- Se prepară inoculul bacterian utilizând o cultură bacteriană pură de 24 de ore. Suspensiile bacteriene se realizează în 20 ml ser fiziologic steril, la o densitate de 0,5 McFarland prin comparaţie cu un etalon de turbiditate, sau 85%T- 91%T, verificată cu ajutorul turbidimetrului Biolog, SUA;

- Coloana 1: se suplimentează cu câte 10 µl din soluţiile corespunzătoare de antibiotice dar nu se inoculează cu suspensie bacteriană. Pentru rândul H se utilizează o soluţie de antibiotic de grad terapeutic (standard de referinţă);

- Pe fiecare placă se prevăd 3 rânduri de godeuri pentru martori pozitivi (C+), conţinând mediu de cultură nesuplimentat cu agent antimicrobian, dar cu inocul bacterian (godeurile din rândurile A, B și C, coloanele 2-11);

- Godeurile din coloanele 2-11 vor fi inoculate cu câte 10 µl din suspeniile bacteriene, câte o tulpină pe fiecare coloană, schimbând vârful pipetei la fiecare godeu;

- Godeurile din coloana 12 nu se suplimentează cu antibiotic și nu se inoculează cu suspensii bacteriene (C-);

- Se urmăreşte respectarea regulii 15-15-15: fiecare interval de timp de la prepararea suspensiei bacteriene până la inoculare, de la inoculare până la adăugarea antibioticului şi de la finalizarea plăcii până la introducerea în incubator să nu depăşească 15 minute;

- Se sigilează microplaca cu parafilm pentru a preveni evaporarea și se incubează la 36°C timp de 24 ore.

		Martor –	*E. coli*	*A. hydrophila*	*P. aeruginosa*	*K. pneumoniae*	*A. baumanii*	*E. faecalis*	*E. faecium*	*S. aureus*	*B. cereus*	*B. subtilis*	Martor –
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Martor +	A	100	90+10	90+10	90+10	90+10	90+10	90+10	90+10	90+10	90+10	90+10	100
Martor +	B	100	90+10	90+10	90+10	90+10	90+10	90+10	90+10	90+10	90+10	90+10	100
Martor +	C	100	90+10	90+10	90+10	90+10	90+10	90+10	90+10	90+10	90+10	90+10	100
Pen. 1	D	100+ 10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	100
Pen. 2	E	100+ 10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	100
Pen. 3	F	100+ 10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	100
Pen. 4	G	100+ 10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	100
Standard ref.	H	100+ 10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	90+10 +10	100

Figura 9. Model de pregătire a microplăcii pentru testarea a 4 extracte brute de penicilină (Pen. 1- Pen. 4) pe 10 tulpini bacteriene din specii diferite. Toate godeurile: 100 sau 90 µl - mediu de cultură (negru); rândurile D-F: 10 µl soluţie din suspensia de antibiotic corespunzătoare (roşu); rândul H: 10 µl soluţie antibiotic de referinţă (roşu); coloanele 2-11: 10 µl inocul bacterian (verde).

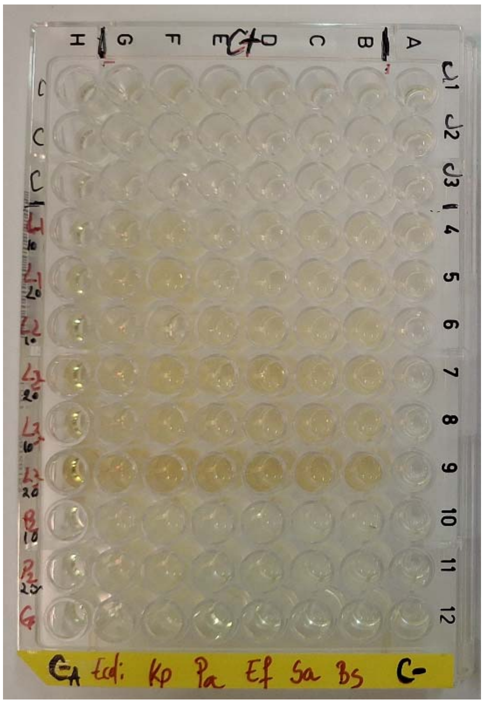


Figura 10. Model de pregătire a microplăcii pentru testarea a patru extracte brute de antibiotic, fiecare în două concentraţii, pe şase tulpini bacteriene. Coloana A: 100 µl mediu de cultură; restul plăcii: 90 µl mediu de cultură; cu excepţia godeurilor din coloana A, rândurile 4, 6 , 8 şi 10: câte 10 µl soluţie de penicilină (L1, L2, L3, P2), rândurile 5, 7 , 9 şi 11: câte 20 µl soluţie de penicilină (L1, L2, L3, P2), rândul 12: câte 10 µl soluţie de penicilină G standard. Coloanele G – B: câte 10 µl inocul bacterian cu tulpini de *E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa, E. faecalis, S. aureus* şi *B. subtilis*.

Citirea microplăcilor şi interpretarea rezultatelor

Notă: Acest exerciţiu de estimare a efectului antimicrobian pe baza absorbanţei se bazează pe un protocol simplificat. Nu se vor realiza comparaţii directe între efectul antimicrobian al diferitelor extracte împotriva tulpinilor din specii diferite, fără a ţine cont de martori. Ecuaţiile de calibrare trebuie să ia în considerare o serie de factori printre care configuraţia spectrofotometrului și dimensiunile celulare (Mira și colab., 2022), dar și eventuala coloraţie a extractelor sau formarea de precipitat.

Modul de lucru:

- Se măsoară absorbanţa la lungimea de undă 595 nm, cu agitare, utilizând cititorul de microplăci Apollo 11, Berthold, Germania;
- După efectuarea a trei citiri pentru o microplacă, se salvează datele și se transferă într-un fișier Excel;
- Se calculează media citirilor, precum și valorile mediei și deviaţiei standard pentru replicate, martorii negativi și martorii pozitivi;
- Pentru a evalua calitatea și robusteţea testului, se calculează pentru fiecare tulpină valoarea factorului Z pe baza valorilor deviaţiei standard și valorilor medii ale densităţii optice (OD), conform ecuaţiei:

$$\text{Factor Z'} = 1 - \frac{\text{3SD martor negativ} + \text{3SD martor pozitiv}}{\text{OD martor negativ} - \text{OD martor pozitiv}}$$

Testul ar trebui să aibă valori ale factorului Z' de cel puţin 0,5 pentru a fi considerat suficient de robust și mai mare de 0,7 pentru a fi considerat excelent (Campbell, 2011).

Realizarea curbei etalon pentru şi determinarea densităţii celulare pentru *E. coli:*

- Se vor utiliza valorile din Tabelul 2, conform modelului din Figura 11;
- Pentru fiecare tulpină testată se calculează şi se reprezintă grafic valorile multiplicării bacteriene în condiţii optime, respectiv sub acţiunea agenţilor antimicrobieni, utilizând ca model orientativ curba de creştere pentru *E. coli;*
- Se evaluează efectul inhibitor al agenţilor antimicrobieni utilizaţi, calculând procentul de supravieţuire al bacteriilor în prezenţa antibioticului, comparativ cu martorii pozitivi și negativi, după formula:

$$\text{Procent de supravieţuire} = \frac{\text{OD probă} - \text{OD martor pozitiv}}{\text{OD martor pozitiv} - \text{OD martor negativ}} \times 100$$

Tabelul 2. Valorile densităţii celulare pentru *E. coli* (bacterii/ml) pe baza absorbanţei

OD la 600 nm	**Densitate celulară (bacterii/ml)**
0,5	4×10^8
0,8	$6,4 \times 10^8$
1	8×10^8
1,2	$9,6 \times 10^8$
1,49	$1,19 \times 10^9$

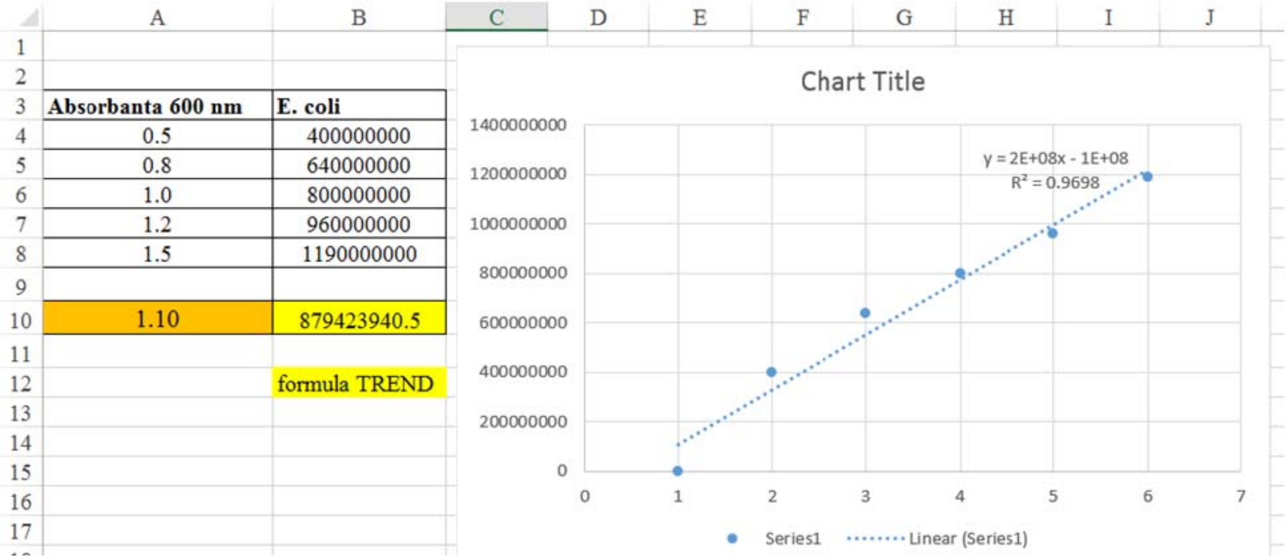


Figura 11. Model de realizare a curbei etalon pentru determinarea densităţii celulare

Metoda III - Evaluarea efectului antimicrobian asupra biofilmului bacterian

Protocol pentru analiza cantitativă a biofilmului prin colorare cu cristal violet

Notă: Protocolul de lucru descris mai jos, bazat pe cuantificarea biomasei, este unul general, având obiectivul de a investiga capacitatea tulpinilor bacteriene de a dezvolta biofilme.

- Numărul replicatelor şi schema microplăcilor se stabilesc în prealabil, pentru fiecare experiment;
- Pe fiecare placă se prevede un număr corespunzător de godeuri pentru martorii negativi (mediu de cultură fără inocul bacterian) şi martorii pozitivi (tulpini bacteriene cu capacitate cunoscută de a forma biofilm);
- Prepararea suspensiilor bacteriene în ser, la o densitate de 0,5 McFarland sau 85%T;
- Inocularea suspensiilor bacteriene în godeuri conţinând mediu de cultură lichid potrivit pentru dezvoltarea bacteriilor testate (bulion peptonat, bulion Mueller Hinton, mediu minimal cu săruri etc), la un volum final de 100 -110 µl şi o densitate aproximtivă de 10^4 -10^5 celule/godeu;
- Incubarea timp de 24 de ore la 36°C pentru tulpini din mediul clinic sau 48 de ore la 25°C pentru tulpini izolate din mediul înconjurător;
- Îndepărtarea mediului de cultură;
- Clătirea microplăcii cu apă distilată sterilă pentru îndepărtarea celulelor planctonice. Clătirea se face cu atenţie, pentru a nu dizloca fragmente de biofilm;
- Colorarea biofilmului prin adăugarea a 120 µl soluţie cristal violet 0,1% şi menţinerea timp de 10 minute;
- Eliminarea colorantului şi clătirea microplăcii cu apă distilată sterilă până când apa rămâne incoloră. Clătirea se face cu atenţie, pentru a nu dizloca fragmente de biofilm;
- Uscarea microplăcii;
- Eluarea colorantului reţinut de biofilm în 120 µl etanol 95% (se pot utiliza şi alţi solvenţi precum etanol şi acetonă, metanol, acid acetic, DMSO) (Figura 12);
- Măsurarea absorbanţei soluţiei etanol-cristal violet la lungimea de undă 595 nm, utilizând cititorul de microplăci Apollo 11, Berthold, Germania;

- După efectuarea a trei citiri pentru o microplacă, se calculează media citirilor, iar pe baza valorilor medii ale densităţii optice a replicatelor se determină capacitatea tulpinii respective de a forma biofilme. Astfel, tulpinile bacteriene se clasifică în:

- neaderente (OD probă ≤ OD martor negativ)
- slab aderente (OD martor negativ < OD probă < 2 OD martor negativ)
- moderat aderente (2 OD martor negativ < OD probă < 4 OD martor negativ)
- puternic aderente (OD probă > 4 OD martor negativ) (Stepanović şi colab., 2000).

Protocol pentru evaluarea efectului anti-biofilm al antibioticelor brute obţinute în laborator

Notă: Acest protocol este adaptat pentru evaluarea capacităţii antibioticelor obţinute în laborator de a împiedica formarea biofilmului bacterian şi utilizează microplăcile deja citite pentru evaluarea efectului antimicrobian asupra bacteriilor planctonice, conform protocolului descris la Metoda II. Acest test nu se aplică în scopul evaluării efectului bactericid asupra bacteriilor din biofilmul matur.

Modul de lucru:

- Îndepărtarea mediului de cultură;

- Clătirea microplăcii cu apă distilată sterilă pentru îndepărtarea celulelor planctonice;

- Colorarea biofilmului prin adăugarea a 120 µl soluţie cristal violet 0,1% şi menţinerea timp de 10 minute;

- Eliminarea colorantului şi clătirea microplăcii cu apă distilată sterilă până când apa rămâne incoloră;

- Uscarea microplăcii;

- Eluarea colorantului reţinut de biofilm în 120 µl etanol 95%;

- Măsurarea absorbanţei soluţiei etanol-cristal violet la lungimea de undă 595 nm, utilizând cititorul de microplăci Apollo 11, Berthold, Germania;

- După efectuarea a trei citiri pentru o microplacă, se calculează media citirilor, iar pe baza valorilor medii ale densităţii optice a replicatelor se determină capacitatea fiecărui antibiotic de a preveni formarea biofilmului bacterian, pentru fiecare tulpină, denumit procentul de inhibiţie a biofilmului, după formula:

$$\text{Procent de inhibiţie} = \frac{\text{OD martor pozitiv} - \text{OD probă tratată}}{\text{OD martor pozitiv}} \times 100$$

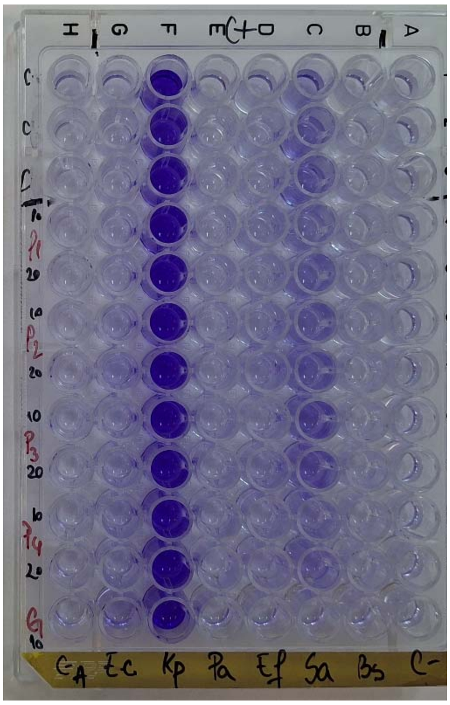


Figura 12. Evaluarea efectului antimicrobian asupra producerii biofilmului. al extractelor brute de antibiotic (P1 – P4) pe tulpini bacteriene de *E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa, E. faecalis, S. aureus* și *B. subtilis*.

Întrebări și exerciții

1. De ce se utilizează o varietate de tulpini bacteriene pentru eva
2. luarea potențialului antimicrobian al compușilor testați?
3. De ce sunt necesare repetiții ale evaluărilor experimentale (duplicate/triplicate)?
4. Care este scopul utilizării inoculului bacterian cu turbiditate standardizată de aproximativ 0,5 McFarland? Ce neajunsuri poate să aibă totuși abordarea pe baza turbidității?
5. Care este rolul controlului pozitiv? Dar al controlului negativ?
6. Care este diferența între martorii negativi din prima și ultima coloană a microplăcii? Ce indică fiecare?
7. Oferiți o interpretare integrativă a rezultatelor obținute pentru fiecare din cele trei metode.
8. Care sunt mecanismele genetice ale rezistenței bacteriene la antibiotice?
9. Cum pot reacționa bacteriile în cazul aplicării unor doze subinhibitorii ale antibioticului?
10. Ce concentrații de antibiotic sunt necesare pentru a asigura prevenția formării biofilmului? Dar pentru distrugerea biofilmului matur? Exemplificați aplicații cu relevanță medicală pentru fiecare din cele două situații.
11. Punctați în acest context noțiunile de toleranță, rezistență și reziliență.
12. Accesați linkurile de mai jos și urmăriți protocoalele dezvoltate de O'Toole și colab. (2011) și de Skogman și colab. (2016). Identificați asemănările și deosebirile dintre cele două metode și cea utilizată de noi în laborator. https://www.jove.com/v/2437/microtiter-dish-biofilm-formation-assay https://app.jove.com/v/54829/a-platform-of-anti-biofilm-assays-suited-to-the-exploration-of-natural-compound-libraries
13. Imaginați un protocol de lucru pentru o metodă de screening cu randament crescut pentru evaluarea efectului bactericid al compușilor asupra biofilmului matur.

Investigarea clusterului de gene responsabile de biosinteza penicilinei

Activităţi şi competenţe:
- Verificarea genelor implicate în biosinteza metaboliţilor secundari
- Biotehnologie analitică: metode moleculare şi bioinformatice
- Manipularea genetică şi optimizarea compuşilor

Principiul lucrării

Izolatele capabile să producă metaboliţi secundari cu potenţial antibiotic pot fi explorate la nivel genomic pentru identificarea genelor clusterului de biosinteză. Tehnica amplificării PCR produce cantităţi mari ale unui fragment de ADN strict definit, iar ampliconii pot fi evidenţiaţi prin electroforeză în gel de agaroză.

De la compuşi naturali cu potenţial antimicrobian la clusterul biosintezei

Odată detectată activitatea antimicrobiană a unui complex de produşi naturali obţinuţi prin biosinteză, compuşii de interes sunt mai departe purificaţi printr-o combinaţie de metode cromatografice, pentru elucidarea componenţei şi ulterior descifrarea structurii moleculelor active. Tulpina producătoare este la rândul ei supusă investigării. Secvenţierea şi explorarea genomului, cuplată cu transcriptomica, permit identificarea clusterului de gene implicate în biosinteza moleculei naturale active. Pentru a confirma că grupul corect de gene a fost identificat, se efectuează experimente de inactivare a genelor. Mutantele rezultate sunt analizate pentru producerea unor produşi particulari. Odată ce întreg complexul de gene a fost inactivat, tulpina ar trebui să nu producă compusul de interes (Greule şi colab., 2017). Cu toate că performanţele şi accesibilitatea acestor explorări beneficiază în permanenţă de îmbunătăţiri substanţiale, există în continuare limitări de costuri şi de timp, care trebuie analizate. O varietate de teste preliminare pot stabili dacă într-adevăr compuşii investigaţi sunt suficient de promiţători pentru a justifica trecerea la pasul următor în dezvoltarea unui medicament.

După descoperirea penicilinei, unele suşe de *Penicillium* s-au dovedit capabile să producă cantităţi mai mari de antibiotic comparativ cu tulpina originală *P. rubens* ATCC 9478, izolată de Alexander Fleming. Astfel a fost cazul izolatului selectat la *Northern Regional Research Laboratory* (NRRL), SUA, şi adoptat pentru producţia industrială, *P. chrysogenum* (Thom) NRRL 1951 (reclasificat ulterior ca *P. rubens*). În întreaga lume au fost iniţiate o serie de programe de îmbunătăţire a tulpinilor prin metode clasice de izolare şi selecţie după inducerea aleatorie a unor mutaţii, vizând creşterea producţiei de antibiotic. De-a lungul timpului au fost obţinute tulpini superproducătoare, precum Wisconsin 54-1255 la Universitatea din Wisconsin, SUA; P1 şi P2 la Panlabs Inc., Taiwan; AS-P-78 şi AS-P-99 la Antibioticos S.A., Spania; NMU2/40 şi B14 la Biotika a.s., Slovacia, şi altele. Amplificarea genelor implicate în biosinteza penicilinei la tulpini cu productivitate mare a fost iniţiată în anii 1980 (Barredo şi colab., 1989, Smith şi colab., 1989). Regiunea amplificată a fost caracterizată, observându-se apariţia unor repetiţii în tandem (Fierro şi colab., 1995). La fungii producători de penicilină G, cele trei gene care codifică enzimele ACV-sintetaza (*pcbAB*), izopenicilin-N-sintetaza (*pcbC*) şi izopenicilin-N-aciltransferaza (*penDE*) se află în acelaşi cluster, iar reglarea biosintezei a

fost în mare parte elucidată (Brakhage şi colab., 2004). Ipoteza copiilor multiple ale genelor ce codifică enzimele responsabile a fost confirmată (Šmidák şi colab., 2010), tulpinile industriale având în general două până la opt copii copii ale clusterului biosintezei. Corelaţia dintre dublurile clusterului de gene din calea biosintezei și superproducţia de penicilină își pierde însă semnificaţia la un număr mare de copii, iar superproducţia de penicilină nu creşte exponenţial (Nijland și colab., 2010). Studii mai noi indică faptul că secreţia unei mari cantităţi de penicilină nu este neapărat dependentă de numărul de copii ale celor trei gene, ci este mai degrabă rezultatul implicării unui complex de mecanisme reglatoare (Ziemons și colab., 2017). Recent, analiza genomică comparativă între diverse tulpini de *P. rubens* indică, pe lângă duplicări ale clusterului biosintezei la variantele industriale, și modificări ale secvenţelor genelor efectoare la tulpinile sălbatice (Pathak și colab., 2020). Astfel, abordarea clasică de îmbunătăţire a tulpinilor prin mutageneză e posibil să fi ratat unele soluții pentru optimizarea designului molecular al penicilinei în comparație cu selecția naturală a fungilor de tip sălbatic. Speciile de *Penicillium* reprezintă platforme versatile de producere a unei varietăţi de metaboliţi secundari, printre care peptide non-ribosomale, policetide și molecule hibride (Guzmán-Chávez și colab., 2018). În contextul evoluției fenomenului de rezistență la antibiotice, abordările viitoare ar putea folosi soluții explorate de natură ca model pentru dezvoltarea unor noi antibiotice.

Tehnica amplificării folosind reacţia în lanţ a polimerazei (PCR) poate fi o bună alegere pentru verificarea prezenţei genelor implicate în biosinteza antibioticelor la tulpini de *Penicillium rubens*. Metoda implică pregătirea matricii de ADN genomic, amplificarea unor fragmente ţintă specifice genelor ce codifică enzimele căii de biosinteză și vizualizarea ampliconilor. În cazul investigării unor tulpini bacteriene, matricea de ADN poate fi reprezentată de o suspensie de ADN genomic extras în prealabil, de o suspensie bacteriană sau o mică cantitate de colonie proaspătă (*colony-PCR*). În cazul fungilor, matricea de ADN poate fi o suspensie de ADN genomic extras în prealabil sau o suspensie de spori. Extragerea ADN-ului genomic este laborioasă, consumatoare de timp, costisitoare și implică substanțe chimice toxice. O tehnică rapidă și robustă este *squash-PCR*, care presupune spargerea sporilor și eliberarea ADN-ul genomic fungic ca șablon pentru amplificare (Yuan și colab., 2023).

Specificitatea reacţiei PCR este determinată de amorse sau primeri (oligonucleotide de ADN monocatenar cu o lungime de 15-30 pb), care sunt complementare secvențelor de ADN ce flanchează regiunea țintă. Ca urmare a reacției PCR, sunt produse milioane sau miliarde de copii ale unui fragment de ADN aflat între amplasamentele de cuplare a amorselor. O amplificare de succes poate fi realizată pornind de la doar câteva copii ale ADN matriţă, într-un aparat special destinat acestui proces, denumit thermocycler.

În acest scop, numărul de cicluri variază, în funcție de aplicație, în mod curent de la 20 la 40. Deoarece fiecare ciclu de PCR începe cu denaturarea moleculelor de ADN dublu catenar la temperaturi ridicate (95°C), este esențial să se utilizeze o ADN polimerază termostabilă, de obicei Taq polimeraza sau derivații acesteia. Pentru a reduce amplificarea nespecifică și pentru a atenua problemele care rezultă din lipsa de specificitate a amorselor se utilizează adesea polimeraza HotStart. Enzima este modificat în așa fel încât să rămână complet inactivă la temperatura camerei. O incubare prelungită (3-15 minute) la 95°C este necesară pentru activarea enzimei. Etapele reacției:

- Prima etapă a acestei reacții ciclice este denaturarea. În timpul denaturării în urma încălzirii amestecului la o temperatură foarte ridicată, la 94-95°C, punţile de hidrogen dintre cele două catene ale ADN-ului se rup.

• În etapa următoare denumită aliniere, oligonucletidele sintetice (amorsele) se aliniază lângă regiunile complementare al matriței monocatenare a ADN. Această aliniere va avea loc la temperatura de topire a amorselor, de obicei între 40 și 60°C.

• Ultima etapă a acestei reacții este elongarea, care este de fapt sinteza propriu zisă de ADN, la o temperatură de 72°C. În prezența ionilor de magneziu și a dezoxiribonucleotidelor, ADN polimeraza termostabilă va extinde amorsele atașate matriței țintă, în direcţia 5' – 3'. Cu ajutorul repetării ciclice a etapelor sus-menționate va avea loc amplificarea segmentului ţintă de ADN.

Pentru desfăşurarea optimă a PCR, amestecul de reacție trebuie să conțină următoarele:

- Amorse: oligonucleotide sintetice care servesc ca punct de plecare pentru sinteza lanțului complementar cu ajutorul ADN polimerazei, marcând cele două capete ale regiunii care trebuie să fie amplificată. Dacă produşii de amplificare urmează a fi introduşi într-un analizor genetic automat, se utilizează amorse marcate fluorescent;
- Soluție tampon: oferă concentrația ionică și pH-ul necesar pentru buna funcționare a polimerazei;
- ADN polimerază: enzima care facilitează sinteza lanțului complementar. Cel mai des utilizată este ADN polimeraza Taq, izolată din bacteria termofilă *Thermus aquaticus*;
- $MgCl_2$: cofactorul polimerazei Taq;
- Nucleotide libere (dezoxiribonucleotid trifosfaţi, dNTP): monomerii reacției;
- ADN țintă: suspensia de spori zdrobiţi;
- Apă ultrapură: pentru diluarea mediului de reacție la concentrația optimă.

Reacția PCR care implică mai mult de o pereche de amorse, pentru a amplifica regiuni multiple din ADN, este denumită PCR multiplex. PCR multiplex este de obicei mai dificil de implementat decât reacţia standard, fiind utilizate în mod obișnuit amestecuri preformulate de tipul Master Mix. Acestea conţin, într-o mixtură preformulată şi tamponată, ADN-polimeraza termostabilă, dNTP din fiecare tip, ionii de Mg^{2+} şi eventual coloranţii necesari pentru migrare. Pentru optimizarea reacţiei trebuie să se ţină cont de specificitatea şi temperatura de aliniere a amorselor utilizate, precum şi de lungimea fragmentelor ţintă.

Designul amorselor implică utilizarea unor platforme bioinformatice care generează secvenţe ale unor primeri conform unor specificaţii predeterminate, pe baza secvenţei genetice de interes. Astfel de instrumente sunt PrimerBlast a *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/), Primer3 (https://primer3.ut.ee/), PerlPrimer (https://perlprimer.sourceforge.net/), FastPCR (https://primerdigital.com/fastpcr.html), OligoPerfect Designer (https://www.thermofisher.com/ro/en/home/life-science/oligonucleotides-primers-probes-genes/custom-dna-oligos/oligo-design-tools.html) şi multe altele. Perechile de amorse se validează in silico, iar eficienţa amplificării se optimizează in vitro, etape necesare chiar şi atunci când secvenţele amorselor sunt preluate din literatură.

Recomandările generale în designul amorselor:

- Lungimea secvenţelor cuprinsă între 18 şi 30 de nucleotide, în funcţie de heterogenitatea secvenţei;
- Temperatura de topire (Tm) între 52°C şi 58°C (amplificare cu ADN polimerază Taq), cu o diferenţă nu mai mare de 5°C între Tm a celor două amorse;

- Conținutul GC între 40% și 60%, cu terminaţie în C sau G la capătul 3', pentru a promova legarea şi adăugarea a 3-4 nucleotide la capătul 5', situsul enzimei de restricție, pentru a permite tăierea eficientă în cazul clonării;
- Distribuția echilibrată a domeniilor bogate în GC și în AT, evitarea a mai mult de 3 repetiţii succesive ale unei baze şi a dinucleotidelor (de exemplu ACCCC sau AATATAT);
- Evitarea regiunilor cu structură secundară prin verificarea omologiilor intra-primer (mai mult de 3 baze complementare în secvenţa unei amorse) şi inter-primer (primeri sens şi antisens cu secvențe complementare). Aceste circumstanțe pot duce la formarea acelor de păr, auto-dimerilor sau dimerilor de primeri, prejudiciind alinierea amorselor la secvențele de ADN ţintă.

Rezultatul amplificării PCR este ulterior examinat prin electroforeză. Electroforeza în gel este o tehnică utilizată pe scară largă pentru analiza acizilor nucleici și proteinelor, o metodă de bază în laboratoarele de biologie moleculară, pentru pregătirea și analiza ADN-ului (gelul de agaroză) şi a proteinelor (gelul de poliacrilamidă). Principiul tehnicii de separare constă în rata diferenţiată de migrare a compuşilor, pe baza mărimii particulelor, sub influența unui câmp electric. Agaroza este o polizaharidă purificată din alge marine, iar gelul de agaroză se prepară prin suspendarea agarozei deshidratate într-o soluție tampon, prin aducerea la punctul de fierbere până când granulele se dizolvă complet. După răcorire sub jet de apă este adăugat agentul intercalant (bromură de etidiu, RedSafe sau SbyrGreen), iar gelul este turnat într-o tavă. Pe măsură ce agaroza polimerizează, culoarea devine alb opac iar rezultatul este o gelatină flexibilă. În timpul electroforezei, gelul este imersat într-o cuvă care conține o soluție tampon de tris-acetat-EDTA (TAE) sau tris-borat-EDTA (TBE), iar la capete un electrod pozitiv și unul negativ. Soluţia TAE/TBE are proprietăţi de tamponare suficiente şi oferă o bună rezoluţie pentru fragmentele de ADN. ADN-ul care urmează să fie analizat este forțat de câmpul electric să traverseze porii gelului. Sub un câmp electric, moleculele de ADN, încărcate negativ, vor migra de la electrodul negativ – catod (negru) către electrodul pozitiv – anod (roşu). Viteza de migrare a moleculelor de ADN este influenţată de mai mulţi factori: puterea câmpului electric, concentrația de agaroză în gel și mărimea moleculelor de ADN. Moleculele mici de ADN se vor deplasa mai repede decât fragmentele mari. ADN-ul în sine nu este vizibil în interiorul unui gel de agaroză, iar acesta trebuie legat în prealabil de un agent care va fi vizualizat în UV (bromura de etidiu) sau lumină albastră (RedSafe, SbyrGreen etc.). Progresul ampliconilor poate fi estimat urmărind deplasarea benzilor de pigmenţi prezenţi în Master Mix sau în agentul de colorare a probelor. Frontul de migrare generat de banda galbenă este echivalentul unor fragmente ceva mai mici de 50 pb, în timp de banda albastră reprezintă un echivalent de migrare al fragmentelor de 3.500-4.500 pb (în gel de agaroză 1%). De asemenea, markerii ADN conţin pigmenţi precum Orange G, ce reprezintă frontul de migrare, şi xilen cianol, ce migrează echivalent fragmentelor mari de ADN, de aproximativ 4.000 pb. În TAE, albastrul de bromofenol migrează între xilen cianol și Orange G, echivalent unor molecule de ADN de 370 pb.

Verificarea prezenței și determinarea dimensiunii produşilor de PCR se realizează prin migrarea acestora în gel de agaroză de concentraţie 1,5 – 2%, preparat în soluţie tampon TAE/TBE şi conţinând bromură de etidiu sau RedSafe 0,5 μg/μl. Vizualizarea se realizează fie chiar în timpul migrării, utilizând un sistem de fotodocumentare în timp real, fie într-o incintă specială prevăzută cu lampă UV, denumită transiluminator. Determinarea dimensiunii fragmentelor amplificate se realizează prin comparare cu o scară conţinând fragmente de lungime cunoscută. Markerul ADN se alege în funcţie de lungime fragmentelor ţintă aşteptate.

ACTIVITATE EXPERIMENTALĂ

Necesar

- Micelii fungice provenite de la tulpinile de *Penicillium* sp. izolate anterior în laborator și o tulpină de referință (ATCC 9478, ATCC 28089 sau o altă variantă utilizată industrial)
- Lame și lamele din sticlă
- Apă ultrapură liberă de nucleaze
- Master Mix PCR (sau componente: ADN polimerază, dNTP mix, tampon cu $MgCl_2$, premix pigmenţi *DNA loading dye*)
- Amorse sens – suspensie de lucru
- Amorse antisens – suspensie de lucru
- Tuburi PCR 0,2 ml
- Tuburi Eppendorf 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml de grad molecular
- Agaroză
- Soluţie tampon TAE sau TBE
- Soluţie bromură de etidiu sau RedSafe
- Marker ADN (*DNA ladder standard*)
- Pipete, vârfuri de pipetă
- Pix marker permanent
- Sticlărie de laborator: cilindri gradaţi 100 ml, 500 ml și 1000 ml, flacoane Erlenmeyer 250 ml
- Echipament de laborator: balanţă, cuptor cu microunde, thermocycler, sistem complet de electroforeză, frigider, congelator -20°C, microscop optic

Mod de lucru

Amplificarea clusterului de gene responsabile de biosinteza penicilinei la Penicillium sp.

1. ***Designul și verificarea amorselor. Configurarea programului de amplificare***

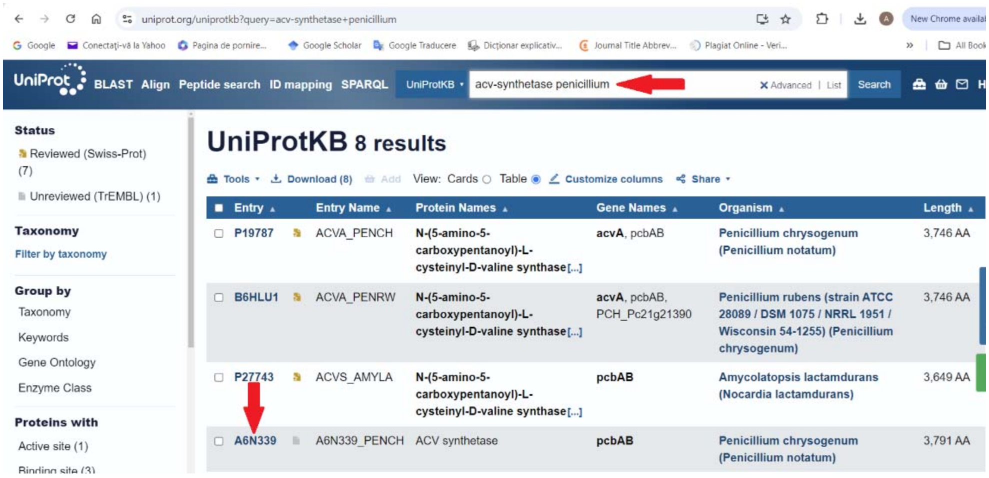
În vederea detecţiei celor trei gene codificatoare ale enzimelor ACV-sintetaza, izopenicilin-N-sintetaza și izopenicilin-N-aciltransferaza, se dau secvenţe ale amorselor corespunzătoare. Urmaţi instrucţiunile de mai jos și completaţi informaţiile lipsă din Tabelul 3:

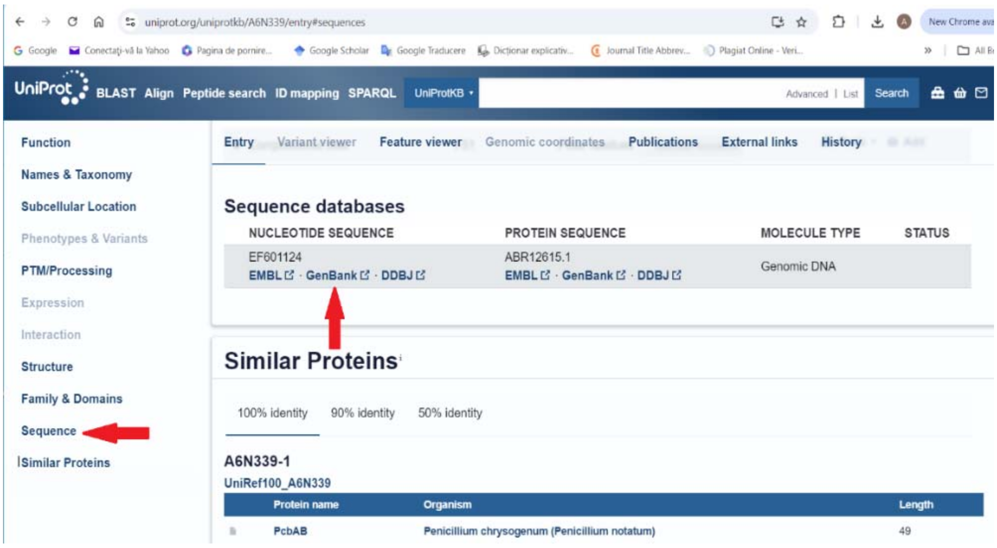
- Utilizând baza de date UNIPROT (www.uniprot.org), căutaţi pe rând fiecare din cele trei proteine (*ACV synthetase, isopenicillin synthetase* și *isopenicillin acyltransferase*, incluzând în căutare *Penicillium*), sau alegeţi la prima căutare intrarea cu codul A6N339-PENCH, pentru care este disponibil întreg clusterul penicilinei (Figura 13A);

- Derulând la secţiunea *Sequence/Sequence databases*, accesaţi secvenţa corespunzătoare de nucleotide din baza de date GenBank (Figura 13B);

- Descărcaţi secvenţa în format text FASTA (Figura 13C) și copiaţi-o într-un document Word. Eliminaţi rândurile prin accesarea funcţiei *Home/Replace/Find ^p/Replace all*;

- Aţi obţinut secvenţa completă a clusterului biosintezei. Verificaţi prezenţa fiecărei amorse prin accesarea funcţiei de căutare și marcaţi fragmentul respectiv. După ce aţi găsit ambele amorse specifice unui fragment ţintă, sens și antisens, determinaţi lungimea fragmentului ţintă prin numărarea nucleotidelor, accesând funcţia *Count/characters* (Figura 14);

A.


B.


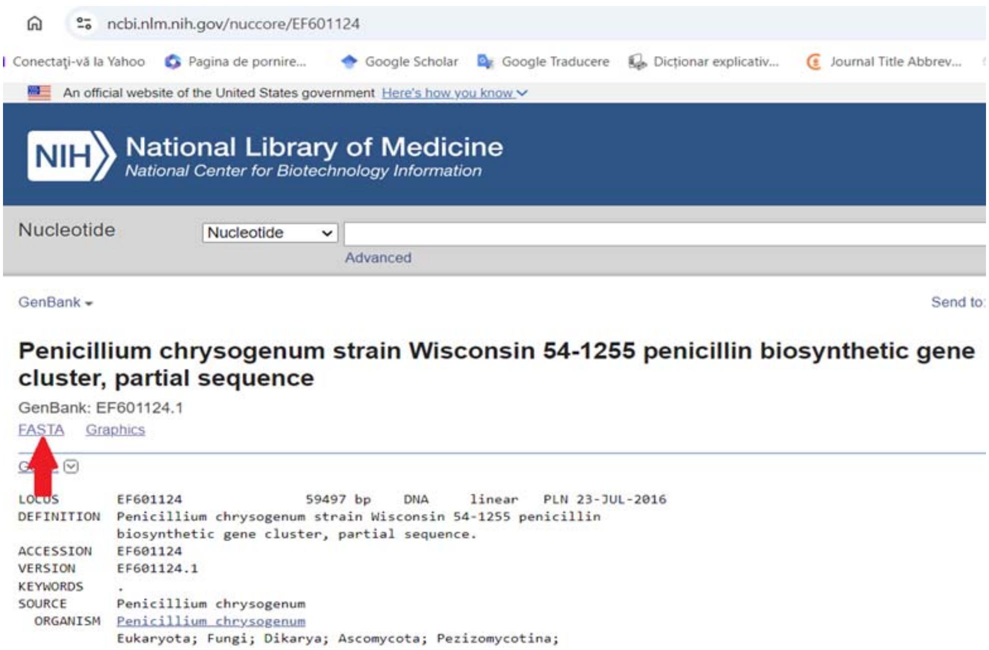
C.


Figura 13. Obţinerea secvenţelor de referinţă. **A.** Identificarea secvenţei de referinţă a enzimeiACV-sintetaza în baza de date UNIPROT; **B**. Accesarea secvenţei de nucleotide a genei codificatoare în platforma GenBank; **C.** Descărcarea secvenţei de nucleotide în format FASTA.

Tabelul 3. Parametrii utilizaţi pentru detecţia clusterului de genei responsabile de biosinteza penicilinei şi condiţiile desfăşurării reacţiei PCR

Gena	Secvenţa amorselor (5'-3')	Dimensiunea fragmentului ţintă (pb)	Temperatura de aliniere (°C)
pcbAB	CCAGTTCAGTCTGGTGCTCA / GTTTACCTTGGCCTGCACA	161	57
pcbC	ACGGCACCAAATTGAGTTTC / GCTACATGGCACACATCACC	*	*
penDE	CGAAGAAGACGGACGAAGA / TGTCATGCTTAATACCCGCA	*	*

Notă: * se vor calcula şi completa valorile corespunzătoare.

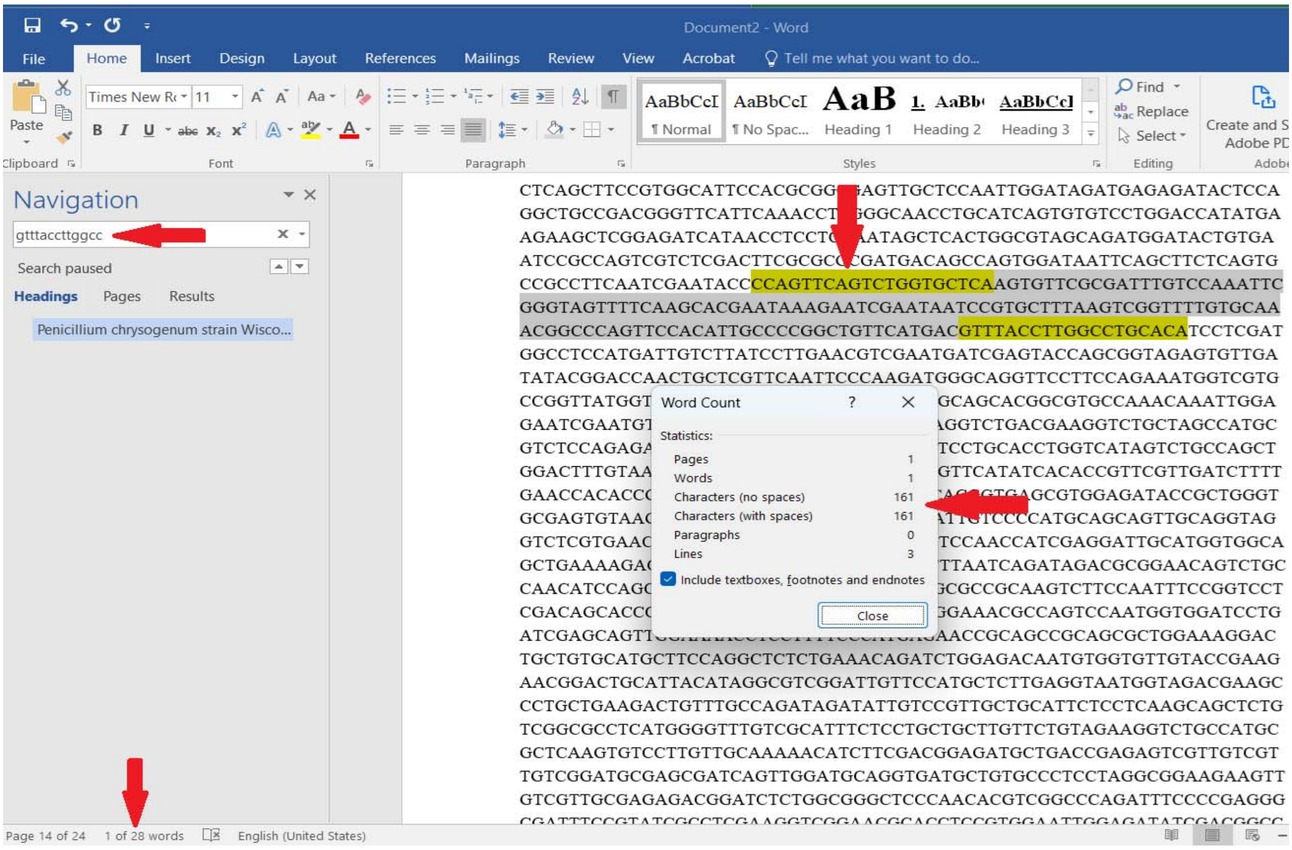
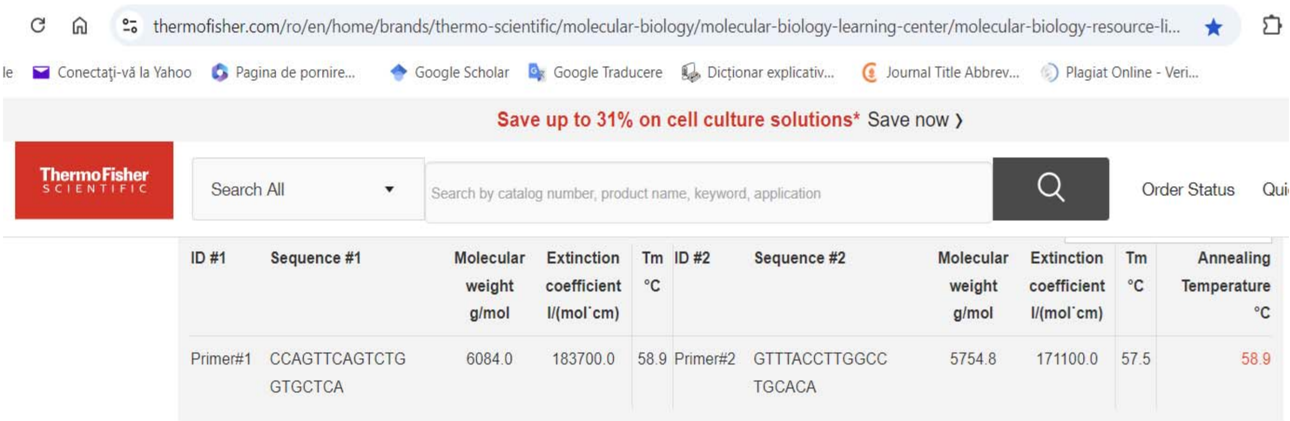


Figura 14. Verificarea amorselor în secvenţa de referinţă şi determinarea lungimii fragmentului ţintă.

- Pentru a calcula temperatura optimă de aliniere şi a verifica compatibilitatea amorselor perechi, accesaţi platforma Tm calculator pe site-ul www.thermofisher.com. Selectaţi tipul ADN polimerazei (*Taq*), metoda (*single pair*), introduceţi secvenţele celor două amorse şi păstraţi concentraţia standard a primerilor la 0,5 µM (Figura 15). Notaţi temperatura de aliniere indicată.

C. Pregătirea suspensiilor de ADN

- Se pregătesc matriţele de ADN fungic prin pipetarea a 50 µl suspensie de spori pe o lamă microscopică şi presarea cu ajutorul lamelei, prin mişcări de frecare. Se verifică la microscop înainte şi după executarea procedurii de strivire a materialului biologic, pentru a verifica disrupţia celulară.



ID #1	Sequence #1	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol˙cm)	Tm °C	ID #2	Sequence #2	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol˙cm)	Tm °C	Annealing Temperature °C
Primer#1	CCAGTTCAGTCTG GTGCTCA	6084.0	183700.0	58.9	Primer#2	GTTTACCTTGGCC TGCACA	5754.8	171100.0	57.5	58.9

Figura 15. Verificarea compatibilității amorselor și calcularea temperaturii de aliniere în platforma ThemoFisher.

D. Pregătirea amestecului de reacție și derularea PCR

Atenție: Toate operațiile se execută purtând mănuși de protecție și se evită contaminarea încrucișată! Înainte de a realiza amestecul de reacție, toți reactivii se decongelează și se omogenizează.

- Se notează tuburile de PCR cu codurile genei țintă și a tulpinilor;

- Se calculează volumele componentelor și se realizează mixul de PCR (volum total de 15 µl per probă, pentru numărul total de probe aflate în lucru + control negativ + control pozitiv), și se vortexează:

- Master Mix PCR (sau componente: suspensii ADN polimerază, dNTP mix, tampon cu $MgCl_2$)
- Amorse sens – suspensie de lucru
- Amorse antisens – suspensie de lucru
- Apă ultrapură liberă de nucleaze

- Se pipetează amestecul în fiecare tub de PCR – câte 13 µl;

- Se pipetează câte 2 µl suspensie spori în fiecare tub, direct în amestec;

- Un tub se păstrează pentru controlul negativ și unul se utilizează drept martor pozitiv;

- Se pipetează 2 µl apă ultrapură în controlul negativ și 2 µl suspensie ADN matriță de referință în controlul pozitiv;

- Se închid cu grijă tuburile și se plasează în thermocycler;

- Se setează programul PCR:

- Etapa 1: denaturare inițială – 5 minute la 94°C – 1 ciclu;

- Etapa 2 - 35 de cicluri:

- Denaturare – 94°C, 60 s
- Aliniere – temperatura și timpul adaptate amorselor utilizate (40-60°C, 30-60 s)
- Elongare – 72°C, timp adaptat lungimii fragmentului țintă așteptat

- Etapa 3: elongare finală – 5 minute la 72°C – 1 ciclu;

- Se răcesc tuburile la 4°C timp de 1 minut;

- Dacă nu se migrează imediat, se păstrează la frigider sau la congelator, după caz.

Evidenţierea ampliconilor rezultaţi

1. ***Prepararea gelului de agaroză:***
   - 100 ml soluţie tampon TAE 1x
   - 1,5 g agaroză
   - 5 µl soluţie bromură de etidiu 10 mg/ml

Notă: se utilizează în general soluţii stoc TAE 50x, care se diluează în momentul utilizării.

2. ***Pregătirea sistemului de electroforeză și turnarea gelului***

- Se pregăteşte tava adecvată cu pieptenii corespunzători numărului de probe, martori şi marker ADN;

- Se sigilează capetele tăvii cu sistemele de închidere furnizate sau cu bandă adezivă;

- Se plasează pieptenii în poziţia corespunzătoare;

- Se dizolvă agaroza în soluţia tampon TAE, într-un pahar Erlenmeyer 250 ml, prin încălzire în cuptorul cu microunde setat iniţial la 700 V. Se reduce gradual intensitatea cuptorului și se prelungește timpul până la topirea completă. Se verifică repetat. **Atenţie:** Prin fierbere gelul poate curge din pahar! După scoaterea din cuptorul cu microunde, agitarea se va face cu precauţie.

- Se răceşte paharul cu gel sub jet de apă până la 50-55°C, folosind o mănușă de termoprotecţie pentru a ţine gura paharului. Se agită continuu prin rotire uşoară;

- Se adaugă soluţia de bromură de etidiu / RedSafe. **Atenţie:** Bromura de etidiu este un reactiv mutagen, cancerigen şi teratogen! După utilizare, se va dispensa vârful pipetei direct în punga pentru deşeuri BIOHAZARD!

- Se toarnă gelul în tavă, îndepărtându-se bulele de aer cu ajutorul unui vârf steril. Nu se utilizează vârful cu care s-a adăugat bromura de etidiu/RedSafe;

- Se aşteaptă circa 10 minute până la întărirea gelului, când acesta devine opac;

- Se îndepărtează pieptenii cu atenţie pentru a nu rupe godeurile.

3. ***Încărcarea probelor în gel***

- Se pregătesc produşii de PCR în ordinea în care urmează a fi încărcaţi pentru migrare, prevăzându-se godeurile pentru markerul ADN, control negativ și control pozitiv;

- Se alege un marker ADN potrivit pentru comparaţie cu fragmentul ţintă;

- Se decongelează markerul şi premixul de pigmenţi (dacă nu s-a folosit un tampon colorat la amplificarea PCR);

- Se încarcă câte 10 µl produs PCR în fiecare godeu, având mare grijă să se respecte ordinea probelor! Dacă premixul PCR nu a conţinut pigmenţi, se colorează fiecare probă cu 2 µl *Orange Loading Dye*. Se notează în caiet schema gelului, împreună cu data și detaliile experimentului;

- Pentru purificarea ADN în vederea secvenţializării se vor utiliza cantităţi mai mari, de 50 µl produs PCR colorat corespunzător;

- Se încarcă câte 5 µl marker ADN în godeurile corespunzătoare;

- Se îndepărtează capacele/banda adezivă de la marginea tăvii;

- Se plasează tava cu gel în cuva de elecroforeză şi se acoperă încet cu soluţie tampon TAE 1x.

4. ***Migrarea produşilor de PCR***

- Se plasează capacul pe cuva de electroforeză, conectându-se electrozii. Se verifică plasarea corectă a tăvii cu gel (*Run to Red*!);
- Se porneşte sursa (5 volţi / cm de gel între cei doi electrozi);
- Se verifică funcţionarea aparatului (fluxul de bule);
- Se verifică după câteva minute direcţia migrării fragmentelor ADN;
- Se aşteaptă până când banda de pigment galben ajunge la capătul gelului;
- Se opreşte sursa de curent electric;
- Se îndepărtează capacul;
- Se scoate cu grijă tava cu gel, ştergând excesul de soluţie tampon.

5. ***Vizualizarea produşilor de PCR și preluarea imaginilor***

A. Pentru sistemul cu migrare şi vizualizare în timp real: Ampliconii se pot vizualiza după aproximativ 20-30 de minute de la pornirea sistemului, iar migrarea poate fi urmărită în timp real. Se poate fotografia gelul pentru documentare.
B. Pentru transiluminator şi sistem de fotodocumentare:

- Se porneşte în prealabil computerul, se pornește camera foto şi se deschide programul de preluare a imaginilor;
- Se plasează tava cu gelul de electroforeză în incinta camerei de vizualizare;
- Se scoate gelul şi se aranjează în poziţie dreaptă;
- Se închide uşa incintei şi se porneşte lampa UV;
- Se vizualizează gelul pe ecranul monitorului verificând captarea integrală a imaginii şi se salvează imaginea (Figura 16).

Atenţie: Dacă se doreşte recuperarea fragmentelor de ADN pentru operaţii ulterioare (purificare din gel şi secvenţializare), expunerea gelului de electroforeză la radiaţiile UV va fi minimă! Imaginile vor fi analizate după ce au fost salvate, cu sursa de UV întreruptă.

6. ***Îndepărtarea gelului de agaroză:***

Atenţie: Gelul de agaroză împreună cu consumabilele contaminate vor fi recuperate în pungi speciale pentru decontaminare! Se va evita contactul direct cu soluţiile de reactivi, cu gelul de electroforeză, cu soluţia tampon, cu vârfurile de pipetă etc. Se va evita contaminarea laboratorului şi a echipamentelor (mese, corpul pipetelor, pixuri, tastatură, robinet etc.).

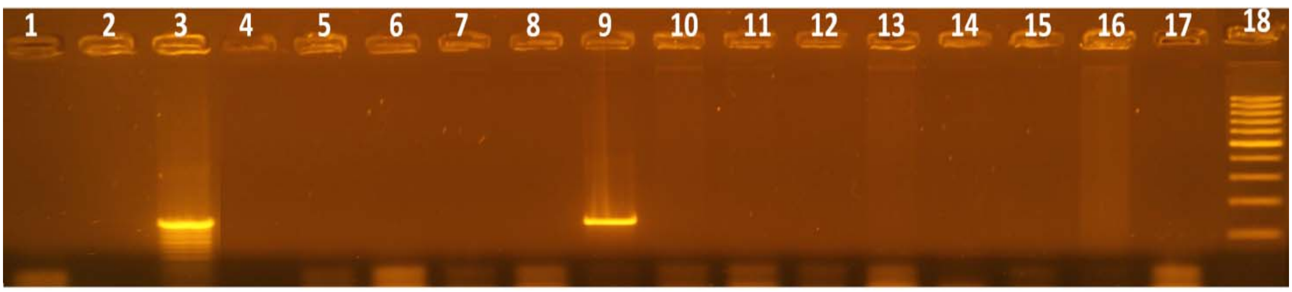


Figura 16. Detecţia genei *pcbAB* în diverse tulpini fungice. Godeul 1: control negativ; godeul 3: control pozitiv; godeurile 2, 4 – libere; godeurile 5-17: probe; godeul 18: marker ADN 1000 pb (SM0371 Thermo Scientific).

Întrebări și exerciții

1. Urmaţi instrucţiunile din protocolul amplificării clusterului de gene responsabile de biosinteza penicilinei descris mai sus și completaţi informaţiile lipsă în Tabelul 3.
2. Analizaţi comparativ protocolul implementat pentru acest experiment cu metodele descrise în articolul publicat de Leitão și colab. (2012): *Penicillium chrysogenum* var. *halophenolicum*, a new halotolerant strain with potential in the remediation of aromatic compounds in high salt environments. Explicaţi diferenţele dintre cele două abordări și deduceţi raţionamente justificative.
3. Ce avantaje și ce dezavantaje prezintă tehnica *squash-PCR*?
4. Care sunt factorii responsabili de reuşita reacţiei de amplificare PCR?
5. Explicaţi de ce se utilizează o polimerază termostabilă şi care este rolul ei.
6. Ce tip de reacţii de control se realizează şi care este semnificaţia lor?
7. Care este funcţia ionilor de Mg^{2+} în cadrul reacţiei?
8. Ce criterii trebuie să îndeplinească amorsele?
9. Care sunt factorii de care trebuie să se ţină cont în designul unei reacţii multiplex PCR?
10. Care este sensul elongării noii catene ADN?
11. Care este principiul migrării ADN în gel de electroforeză?
12. Care este poziţia de plasare corectă a tăvii cu gelul încărcat în cuva de electroforeză? Ce se întâmplă dacă tava se plasează invers?
13. Care este scopul colorării probelor în vederea electroforezei?
14. Care este principiul vizualizării fragmentelor de ADN în gelul de electroforeză?
15. Analizaţi imaginea gelului din Figura 16. Câte probe au fost pozitive pentru gena *pcbAB*? Apreciaţi dimensiunea fragmentului ţintă.
16. Care sunt măsurile de protecţie şi de ce este absolut necesară respectarea acestora?
17. Care sunt condiţiile de calitate pentru consumabilele utilizate în analiza PCR?
18. Ce semnificaţie au moleculele pirogene pentru industria farmaceutică, care sunt metodele de testare și pentru ce forme farmaceutice se impune investigarea pirogenităţii?

Analiza ADMET și optimizarea moleculelor farmaceutice

Activităţi şi competenţe:
- *Drug-likeness*, optimizarea compuşilor, a formulării şi administrării
- Biodisponibilitatea şi toxicitatea moleculelor farmaceutice: screeningul in silico
- Chimie combinatorială şi biotehnologie analitică, metode virtuale şi bioinformatice

Principiul lucrării

Absorbția, distribuția, metabolismul, excreția și toxicitatea (ADMET) dețin un rol cheie în descoperirea și dezvoltarea medicamentelor. Un medicament candidat de înaltă calitate nu numai că ar trebui să aibă eficacitate împotriva țintei terapeutice, ci și să prezinte caracteristici farmacocinetice și toxicitate adecvate, la o doză terapeutică. O serie de modele in silico sunt dezvoltate și îmbunătăţite continuu pentru predicția proprietăților ADMET.

Modelarea profilului ADMET al moleculelor farmaceutice

De la administrarea medicamentului şi până la apariţia efectului terapeutic, în organism au loc o serie de fenomene derulate în faze succesive: biofarmaceutică (eliberarea substanţei medicamentoase şi dizolvarea acesteia în lichidul biologic), farmacocinetică (ADME) şi farmacodinamică (interacţiunea moleculelor substanţei medicamentoase cu receptorii şi declanşarea unor modificări fiziologice cu apariţia efectelor). Realizarea efectului terapeutic vizează toate caracteristicile substanţei medicamentoase, dar şi proprietăţile medicamentului, aspectele administrării și biodisponibilității, particularităţi legate de starea gazdei, diverse interacţiuni etc. Calitatea de potenţial medicament a unei molecule (*drug-likeness*) nu este uşor de evaluat în ceea ce privește atât de multe aspecte. Un set de ghiduri bazate pe asocieri consecvente între structura și proprietățile moleculei au fost generate prin analiza unor parametri de bază ce influenţează profilul ADMET: solubilitate, permeabilitate, biodisponibilitate, volum de distribuție, legarea proteinelor plasmatice, penetrarea la nivelul sistemului nervos central și a barierei hemato-encefalice, legarea la țesutul cerebral, efluxul glicoproteinei P, inhibarea canalului hERG și a citocromilor P450 umani majori (Guan și colab., 2018).

Drug-likeness reprezintă un concept calitativ utilizat în proiectarea medicamentelor, pentru molecule ce se pretează dezvoltării unui medicament, în raport cu factori farmacologici precum biodisponibilitatea. Unele proprietăți moleculare pot influența puternic biodisponibilitatea compusului: numărul de grupe funcţionale donoare şi/sau acceptoare de legături de hidrogen la nivelul perechii/perechilor de electroni neparticipanţi, numărul de legături rotative și masa moleculară. *Drug-likeness* este estimată din structura moleculară, înainte ca substanța să fie sintetizată și testată. Iniţial, conceptul de *drug-likeness* se baza pe „regula celor cinci” (RO5). RO5 (regula lui Lipinski, regula Pfizer 5) evaluează analogia ca medicament, determinând dacă un compus chimic cu o anumită activitate farmacologică sau biologică are proprietăți fizice și chimice care ar permite dezvoltarea unui medicament uman activ pe ruta orală (Lipinski și colab., 2001). RO5 este cea mai cunoscută metodă originală aplicată pentru a distinge dacă o moleculă este bine absorbită în cazul administrării pe cale orală, prin îndeplinirea următoarelor criterii, cu excepția cel mult a unuia:

• Greutatea moleculară (M) ≤ 500 Da;

• Coeficientul de partiție octanol/apă (log P) ≤ 5;

• Numărul de grupe funcţionale donoare de legături de hidrogen la nivelul perechii/perechilor de electroni neparticipanţi (legături N-H și O-H) ≤ 5;

• Numărul de grupe funcţionale acceptoare de legături de hidrogen la nivelul perechii/perechilor de electroni neparticipanţi (atomi de N şi O) ≤ 10,6.

Conform RO5, o moleculă administrată pe cale orală nu ar fi activă dacă încalcă mai mult de unul dintre cele patru criterii. Cu toate acestea, regula nu este potrivită pentru produsele naturale complexe. Metodele de investigare ale proprietăţilor compușilor au fost permanent îmbunătăţite, fiind propuse mai multe reguli și filtre similare cu RO5. Ulterior, au fost concepute programe de screening in silico mult mai complexe care permit evaluarea moleculelor farmaceutice. Pe lângă biodisponibilitate, este foarte important și profilul de siguranță al compușilor, care ilustrează efectele adverse detectabile ale medicamentului. Moleculele lipofile, care au un grad mai mic de polaritate, au o probabilitate mai mare de a declanşa evenimente de toxicitate (Hughes și colab., 2008). Spre exemplu, unul dintre cele mai importante efecte adverse este fosfolipidoza indusă de medicamente, ce reprezintă o acumulare excesivă de fosfolipide în lizozomi (Breiden și Sandhoff, 2019). Regula GlaxoSmithKline 4/400 consideră compușii cu logP > 4 și M > 400 Da ca având un profil de siguranță mai puțin favorabil (Gleeson, 2008). Regula Pfizer 3/75 ia în considerare valorile logP > 3 și aria suprafeței polare totale (tPSA) < 75 $Å^2$ ca generatoare de efecte adverse. O altă modalitate de a testa siguranța unui compus este oferită prin aplicarea regulilor Lilly Med Chem (un set de 275 de reguli) pentru a identifica și respinge compușii reactivi de tipul oxidanților, detergenților, compușii instabili sau compușii lipsiți atât de atomi de oxigen, cât și de atomi de azot (Bruns și Watson, 2012).

Toxicitatea medicamentului poate apărea ca urmare a ingerării unei supradoze de medicament, când o cantitate prea mare de substanţă activă ajunge în organism. Acest lucru se poate întâmpla dacă doza administrată depășește cantitatea prescrisă sau dacă doza prescrisă este prea mare. Predicția toxicității compusului reprezintă o componentă importantă a procesului de dezvoltare a medicamentului. Estimările de toxicitate computațională nu sunt doar mai rapide decât determinarea dozelor toxice la animale, dar pot ajuta și la reducerea experimentelor pe animale de laborator. Mai multe informaţii despre reglementările EMA privind principiile etice ale testării medicamentelor pe animale și conceptele de înlocuire, reducere și rafinare (*Animal Ethics 3R*) sunt disponibile (https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/ethical-use-animals-medicine-testing).

Țintele responsabile de toxicitate sunt ținte proteice care au fost asociate cu reacții adverse la medicamente și cu efecte toxice. Abordările in silico evaluează posibila legare a compușilor investigaţi la țintele de toxicitate, folosind o colecție de farmacofori pe bază de liganzi proteici. Modelele bazate pe farmacofor implică:

• Toxicitatea orală

• Toxicitatea de organ (hepatotoxicitate)

• Punctele finale de toxicitate

- Carcinogenitatea
- Imunotoxicitatea
- Mutagenicitatea
- Citotoxicitatea

• Căile de semnalizare a receptorului nuclear Tox21 (Receptor de hidrocarburi aril (AhR)
- Receptorii de androgeni (AR)
- Domeniul de legare a ligandului receptorilor de androgeni (AR-LBD)
- Aromataza
- Receptorul de estrogen alfa (ER)
- Domeniul de legare a ligandului receptorului de estrogen (ER-LBD)
- Receptor Gamma activat cu proliferarea peroxizomilor (PPAR-Gamma)

• Căile de răspuns la stres Tox21
- Factorul nuclear (nrf2/ARE)
- Elementul de răspuns al factorului de șoc termic (HSE)
- Potenţialul de membrană mitocondrială (MMP)
- Fosfoproteina (supresor tumoral) p53
- Domeniul AAA al familiei ATPazelor care conține proteina 5 (ATAD5).

Dozele toxice ale compușilor sunt adesea date ca valori DL50 în mg/kg greutate corporală. DL50 reprezintă doza letală medie, adică doza de compus la care 50% dintre subiecții expuși mor. Clasele de toxicitate sunt definite în conformitate cu sistemul armonizat global de clasificare a etichetării substanţelor chimice. Valorile DL50 se apreciază în mg/kg:

- Clasa I: fatal în caz de înghițire ($DL50 \leq 5$)
- Clasa II: fatal în caz de înghițire ($5 < DL50 \leq 50$)
- Clasa III: toxic în caz de înghițire ($50 < DL50 \leq 300$)
- Clasa IV: nociv în caz de înghițire ($300 < DL50 \leq 2000$)
- Clasa V: poate fi dăunătoare dacă este înghițită ($2000 < DL50 \leq 5000$)
- Clasa VI: netoxic ($DL50 > 5000$)

ACTIVITATE EXPERIMENTALĂ

Pentru realizarea acestui proiect, veți alege propriile molecule-candidat, în mod ideal substanţe medicamentoase, molecule naturale sau semisintetice, și veți efectua screening-ul in silico al proprietăţilor ADMET. Moleculele candidat pot avea o structură similară (de exemplu, metaciclină și tetraciclină; doxorubicină și daunorubicină; benzilpenicilină și ampicilină) sau diferită (de exemplu, benzilpenicilină și doxorubicină).

Protocol de lucru

Realizaţi o fișă (document Word) cu parcurgerea punctelor de mai jos:

1. Definiţi biodisponibilitatea. (noţiuni din curs)

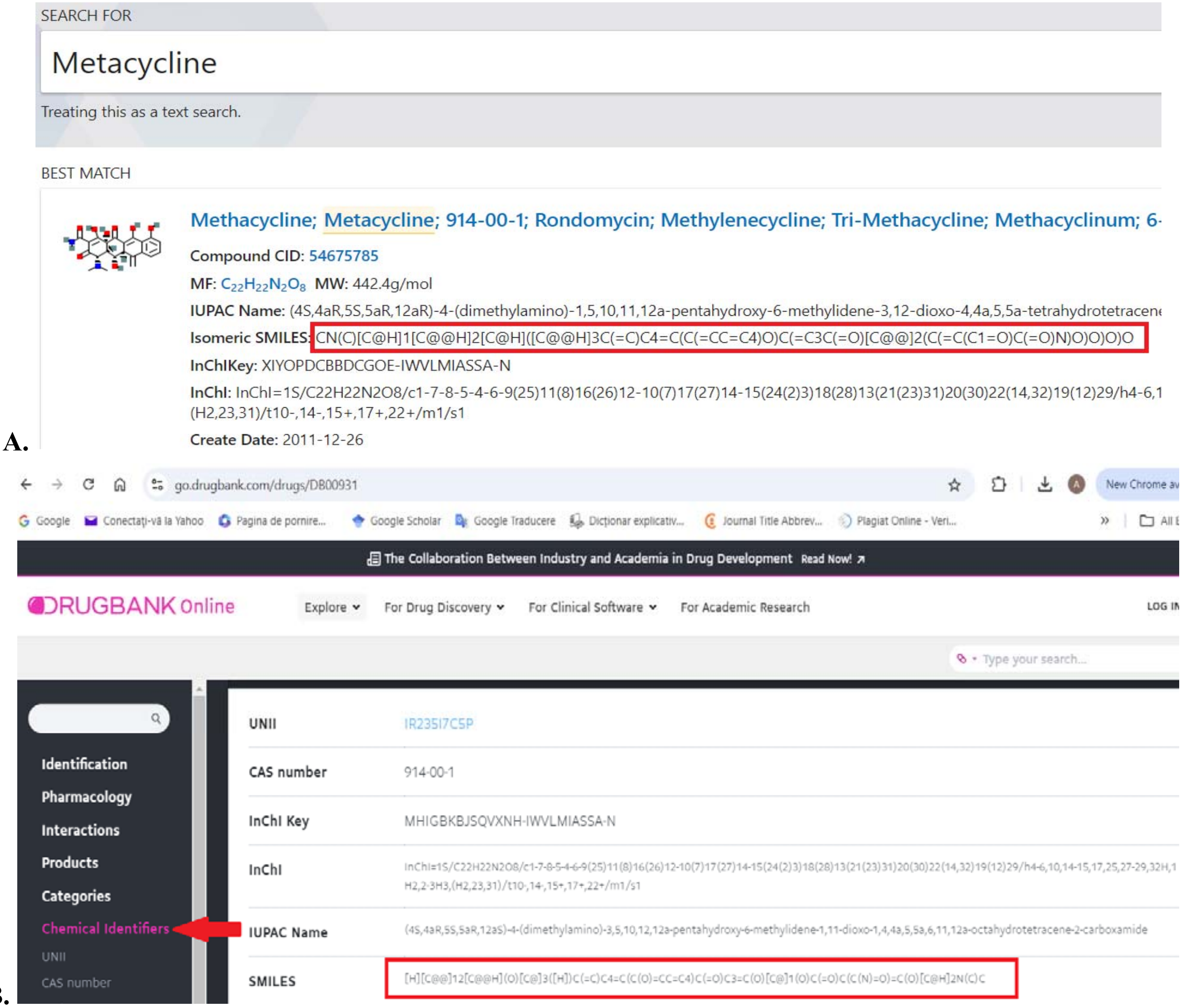
2. Alegeţi două molecule candidat. Descrieţi pentru fiecare din cei doi compuși selectaţi: molecula, medicamentul (dacă este cazul), efectele farmacologice și indicaţiile terapeutice. Dacă aţi ales un medicament aflat în comercializare, puteţi accesa baza de date DrugBank (http://www.drugbank.ca/).

3. Accesaţi una dintre următoarele baze de date pentru a afla mai multe informaţii relevante și a obţine structura moleculei:

• DrugBank (http://www.drugbank.ca/)
• ChEMBL (https://www.ebi.ac.uk/chembldb/)
• WITHDRAWN3 (http://cheminfo.charite.de/withdrawn/)

• PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)

Veți avea nevoie de formula moleculei în formatul SMILES: SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) reprezintă un sistem de notare chimică care permite reprezentarea unei structuri chimice într-un mod care poate fi utilizat de un computer. Găsiți molecula într-una din bazele de date menționate la pasul 2 și copiați *Isomeric SMILES*. Un exemplu pentru structura metaciclinei din baza de date PubChem este disponibil în Figura 17A, iar în baza de date DrugBank găsiți formula SMILES în secţiunea *Chemical identifiers* (Figura 17B).



A. B.

Figura 17. Formula metaciclinei în format SMILES în bazele de date: **A.** PubChem și **B.** DrugBank

4. Screeningul ADMET

a). Partajaţi structura moleculei în platforma admetSAR2 (http://lmmd.ecust.edu.cn/admetsar2/) și analizaţi fiecare criteriu ADMET. Interpretaţi comparativ scorurile obţinute pentru cele două molecule. În vederea predicției proprietăților ADMET (Figura 18), platforma admetSAR2 oferă și posibilitatea căutării compușilor, inclusiv a structurii SMILES. De asemenea, oferă opțiunea predicţiei avansate, unde pot fi scanaţi simultan un număr de până la 10 compuși.

Notă: Platforma admetSAR2 ar putea fi indisponibilă din cauza unor probleme de securitate. Dacă nu funcționează, accesaţi versiunea anterioară (admetSAR1) sau treceți la pasul următor și utilizați programul alternativ.

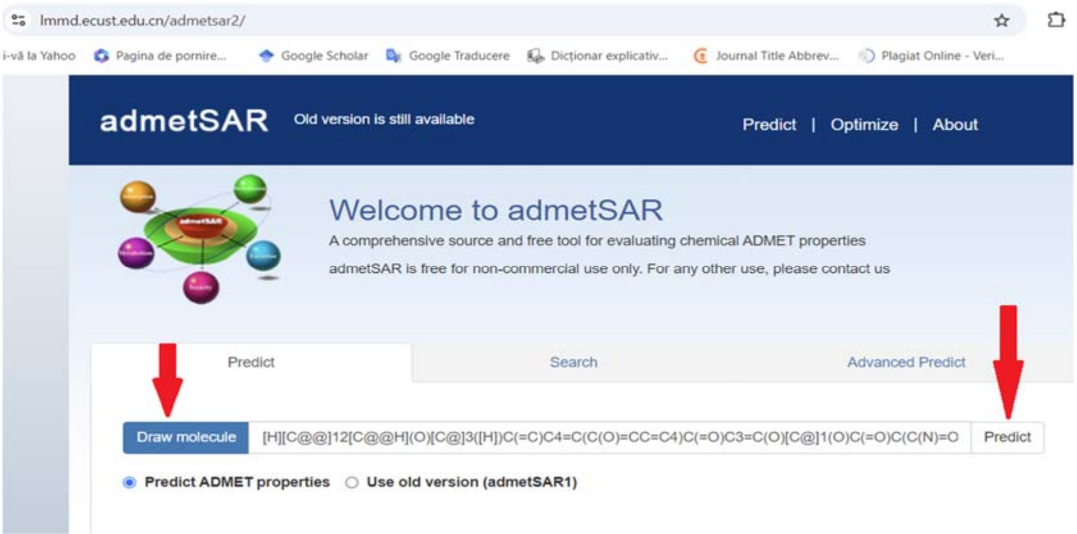


Figura 18. Iniţierea predicţiei proprietăţilor ADMET în platforma admetSAR2

b). Accesaţi ADMETlab2.0 (https://admetmesh.scbdd.com/service/evaluation/index) (Xiong şi colab., 2021). Partajaţi formula SMILES în fereastra programului ADMETlab2.0 şi derulaţi operaţiunea (Figura 19). Analizaţi rezultatele obţinute. Interpretaţi valorile obţinute pentru fiecare dintre cei doi compuşi în ceea ce priveşte profilul parametrilor de chimie medicinală, absorbţie, distribuţie, metabolizare, excreţie, proprietăţi fizico-chimice şi toxicitate. Comparaţi scorurile celor doi compuşi. Arată diferit? Explicaţi.

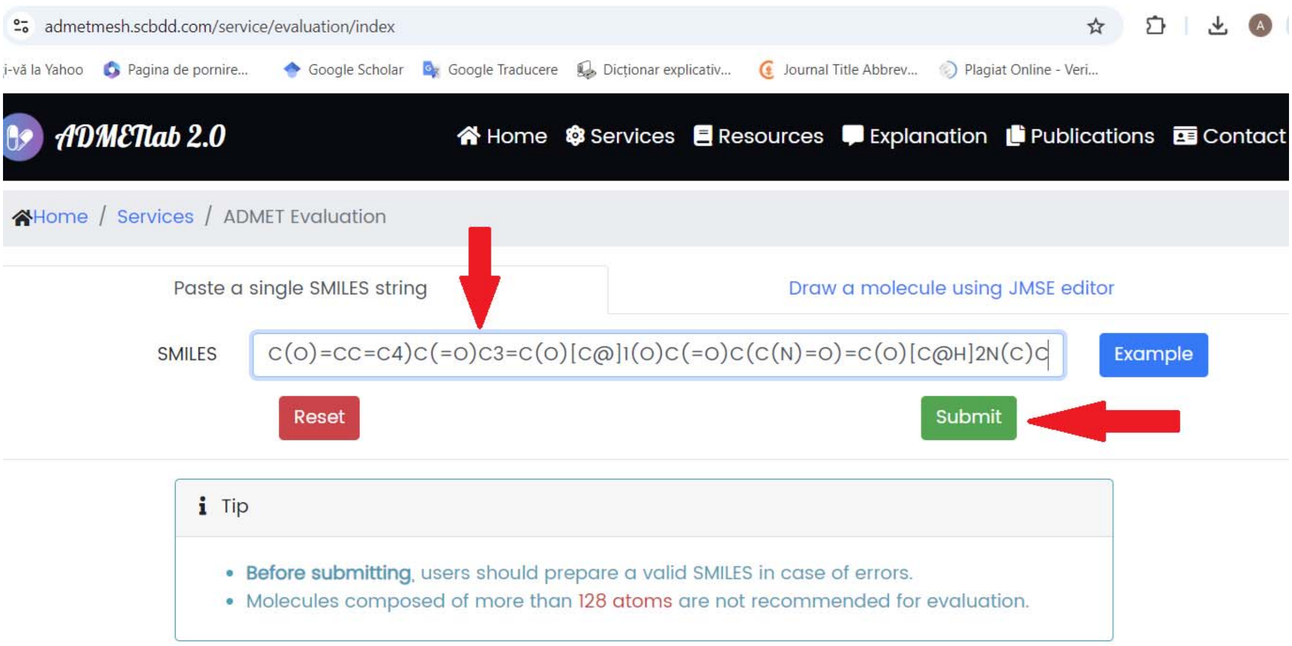


Figura 19. Iniţierea evaluării profilului ADMET în platforma ADMETlab2.0

Notă: Această platformă rulează numai molecule care conţin mai puţin de 128 de atomi. Dacă alegeţi o moleculă mai mare, rulaţi-o doar în pasul următor.

c). Accesaţi platforma SwissADME (http://www.swissadme.ch/index.php) (Daina şi colab., 2017). Încărcaţi formatul SMILES în fereastra dedicată, apoi derulaţi programul (Figura 20). Extrageţi rezultatele obţinute. Interpretaţi valorile generate de fiecare compus pentru proprietăţi fizico-chimice,

lipofilie, solubilitate, farmacocinetică și *drug-likeness*. Repetați pentru cea de-a doua moleculă. Comparați scorurile celor doi compuși. Arată diferit? Explicați.

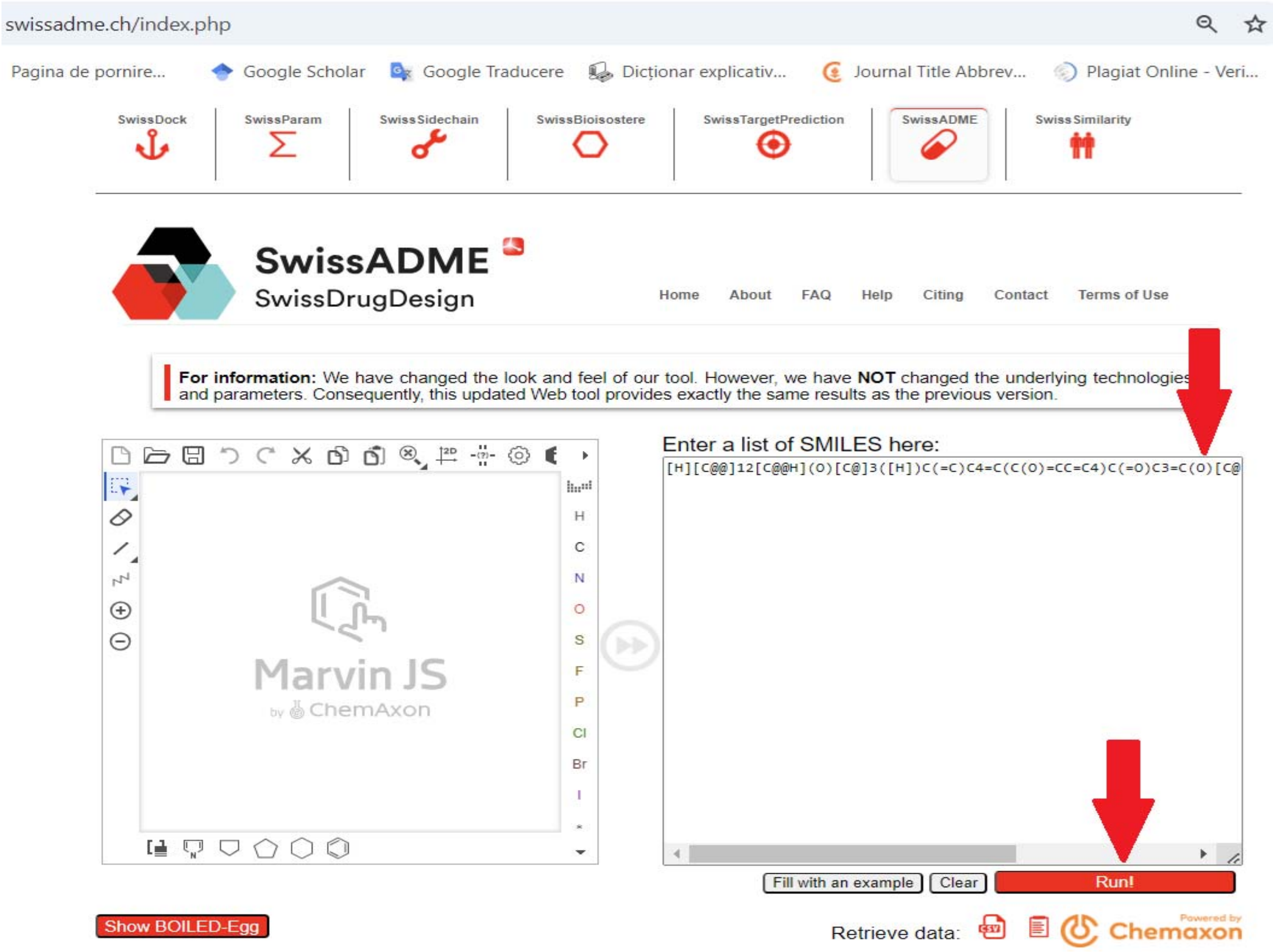


Figura 20. Model de inițiere a screeningului ADME pentru meticiclină în platforma SwissADME

5. Pentru predicția toxicității, accesați platforma ProTox3.0 (https://tox.charite.de/protox3/) și alegeți fereastra *TOX PREDICTION*. Căutați numele moleculei alese și structura moleculară va apărea în fereastră. Bifați parametrii toxicității și rulați programul (Figura 21). Această platformă permite modelări moleculare prin modificarea structurii moleculare direct în fereastra dedicată (Banerjee și colab., 2024). Ce semnificație are această posibilitate de optimizare a moleculei? Extrageți rezultatele predicției și interpretați toxicitatea compusului: valoarea DL50 și relevanța acesteia, clasa toxicologică și semnificația acesteia. Extrageți raportul de toxicitate și interpretați toate efectele relevante. Repetați screeningul toxicității pentru cea de a doua moleculă. Comparați scorurile celor doi compuși. Arată diferit? Explicați.



Figura 21. Exemplu de predicţie a toxicității metaciclinei în platforma ProTox3.0

Screeningul in silico al biofarmaceuticelor pe bază de proteine și peptide

Activităţi şi competenţe:
- Reacţiile adverse la medicamente. Antigenitatea, imunogenitatea și potenţialul alergen
- Siguranţa biofarmaceuticelor generice şi biosimilare
- Predicţia epitopilor în dezvoltarea vaccinurilor
- Biotehnologie analitică, metode virtuale, bioinformatice şi imunoinformatice

Principiul lucrării

Capacitatea de a provoca un răspuns imun se bazează pe două caracteristici ale moleculelor: antigenitate şi imunogenitate. Evaluarea imunogenității și a potenţialului alergen al produselor biofarmaceutice constituie o etapă crucială în procesul cercetării și dezvoltării medicamentului. Modele in silico bazate pe algoritmi imunoinformatici sunt aplicaţi pentru predicţia imunogenității produselor biofarmaceutice.

Reacţiile adverse la medicamente

Reacțiile adverse la medicamente (ADR) se împart în reacții previzibile (legate de acțiunile farmacologice ale medicamentului la indivizi normali) și reacții imprevizibile (legate de răspunsul imunologic al individului și, ocazional, de diferențele genetice la pacienții susceptibili). Reacțiile adverse trebuie diferențiate de evenimentele adverse ale medicamentelor (ADE), care se extind dincolo de reacțiile adverse și includ daune legate de erorile de medicație și interacțiunile medicamentoase ori cu alimentele. În timp ce cunoașterea ADE este importantă în eforturile de îmbunătățire a siguranței pacienților, ADR reprezintă principalul obiectiv al agențiilor de reglementare și al supravegherii post-comercializare a medicamentelor.

Hipersensibilitatea la un medicament (DHR) se referă la simptome sau semne reproductibile în mod obiectiv, iniţiate prin expunerea la acel medicament la o doză tolerată în mod normal de persoanele nehipersensibile. Este un tip de ADR imprevizibilă și include reacții induse de celulele imune sau inflamatorii, precum și alte mecanisme non-imunologice. Alergia la un medicament se referă la o reacție specifică DHR mediată imunologic. Pe baza mecanismului determinat de modul în care medicamentele interacționează cu sistemul imunitar, DHR pot fi clasificate ca reacții alergice și non-alergice. Reacțiile alergice sunt mediate de răspunsul imun specific la un medicament care acționează ca o haptenă care poate duce la toate tipurile de reacții imune: tip I (mediate de IgE, produse de celulele B), tip II (mediate de IgG/IgM), tip III (imunocomplex) și IV (mediate de celule T). Cele mai frecvente sunt de tip I și IV, implicate atât în reacţii imediate (IR) cât și non-imediate (NIR). DHR sunt clasificate clinic ca IR, care apar la 30-60 de minute după administrarea medicamentului sau NIR, ce apar la mai mult de o oră după administrarea medicamentului. Fiind mediate de imunoglobuline E (IgE), IR provoacă urticarie, angioedem sau anafilaxie, iar NIR (mediate celular prin limfocite T; non-IgE mediate) induc manifestări eterogene, variind de la exantem maculopapular sau erupție fixă, până la reacții adverse cutanate severe, reacție medicamentoasă cu eozinofilie și simptome sistemice sau reacții ale unui singur organ, precum boala hepatică indusă de medicamente și reacții specifice medicamentului, cum ar fi sindromul de

hipersensibilitate. Sindromul de hipersensibilitate indusă de medicamente (sindromul DRESS – *drug rash with eosinophilia and systemic symptoms*) este o reacţie severă de tip IV, declanșată în urma administrării unui medicament, mai frecvent asociate fiind medicamentele anticonvulsivante, antivirale, antibiotice, antidepresive și biologice (Franceschini și colab., 2019). IgE sunt esențiale pentru manifestarea și persistența majorității alergiilor de tip imediat, reprezentând o țintă crucială atât în scop de diagnostic, cât și pentru abordări terapeutice, precum imunoterapia specifică alergenului (Krause și colab., 2020). Reacțiile non-alergice includ toate celelalte IR fără un mecanism imunitar demonstrat. Ele nu se pot distinge clinic de reacțiile alergice și apar după interacțiunea medicamentului cu celulele inflamatorii (mastocite, bazofile și neutrofile) prin mecanisme bazate pe supra-inhibarea unor enzime specifice sau ocuparea unor receptori în afara țintei.

Alergiile sunt cauzate de o iniţiere indecvată a răspunsului imun la antigeni, uneori inofensivi, din mediul înconjurător, ce afectează mucoasa căilor respiratorii superioare (rinita), plămânii (astmul), intestinul (alergiile alimentare) și pielea (dermatita). Rolul principal în aceste boli atopice îl reprezintă sensibilizarea alergică mediată de IgE specifice alergenului. Alergiile reprezintă una dintre principalele cauze ale bolilor cronice, cu o incidenţă crescută în ultimele decenii. Pentru a caracteriza un antigen, este crucial să se stabilescă în ce măsură acesta este alergen și respectiv imunogen (Zhang și Tao, 2015). Au fost identificate o serie de mecanisme genetice implicate în sensibilizarea alergică (Bønnelykke și colab., 2013), însă metodele de diagnostic și tratament rămân deficitare.

Antigenii leucocitari umani (HLA) sunt implicaţi în aproape fiecare eveniment cheie din procesul de sensibilizare – răspunsul imun ce are loc la prima expunere la un alergen. HLA reprezintă o serie de glicoproteine codificate într-un complex de gene situate pe mai mulți loci strâns înlănțuiți, localizat pe cromozomul 6. Acest grup de gene numit complexul major de histocompatibilitate (MHC) este legat de funcția sistemului imunitar la om și codifică proteinele aflate pe suprafața celulelor prezentatoare de antigen (APC). HLA sunt esențiale pentru funcția imunitară, fiind împărțite în trei clase MHC (Pichler și Hausmann, 2016).

Elaborarea răspunsului imun este rezultatul cooperării a două categorii de celule: celulele limfoide şi celulele accesorii ale răspunsului imun. Antigenul este recunoscut de celule specializate funcţional şi înglobat de celule accesorii, ce prelucrează şi prezintă antigenul. Prezentarea antigenului este treapta obligatorie care precede recunoaşterea antigenilor proteici de către limfocitele T. Orice celulă care poartă pe suprafaţa ei molecule MHC participă la elaborarea răspunsului imun. Epitopii recunoscuţi de limfocitele T sunt prezentați pe suprafața unei APC, unde sunt legați de moleculele MHC. La om, APC specializate (macrofage, celule dendritice și limfocite B) prezintă peptidele MHC clasa II, în timp ce majoritatea celulelor somatice nucleate prezintă peptidele MHC clasa I. Spre deosebire de limfocitele T, care recunosc doar antigenul prezentat în asociere cu MHC, limfocitele B recunosc și antigenul în forma nativă (Mihăescu, 2003; Nicholson, 2016).

Există trei procese principale prin care celulele T sunt stimulate de medicamente:

A. Conceptul de haptenă: Haptenele sunt compuși mici, chimic reactivi, care se leagă de proteine/peptide și le modifică covalent, stimulând sistemul imunitar înnăscut fie prin legarea covalentă de proteinele celulare, sau prin formarea unui complex haptenă-carrier, care la rândul lui poate forma neoantigeni. Complexul haptenă-proteină este procesat și apoi prezentat celulelor T ca peptide modificate cu haptenă, iar limfocitele T pot reacționa cu aceste peptide.

B. Conceptul pro-haptenă: Pro-haptenele nu sunt chimic reactive și nu pot forma o legătură covalentă cu o peptidă. Pentru a deveni reactive chimic, ele trebuie metabolizate într-o haptenă.

C. Conceptul Pi (interacțiune farmacologică cu receptorii imunitari): un medicament inert din punct de vedere chimic, incapabil să se lege covalent de proteine, este însă capabil să se adapteze unora dintre numeroșii receptori imuni. În anumite circumstanțe, această interacțiune reversibilă medicament-receptor poate activa celulele imune specifice pentru antigenii peptidici, care apoi se extind și provoacă reacții inflamatorii de diferite tipuri (Franceschini și colab., 2019).

În cercetarea și dezvoltarea medicamentelor, compușii pe bază de proteine și peptide sunt în principal vizaţi pentru potenţialele efecte imunogene și alergene. Antigenii polizaharidici au efecte slab imunogene, însă deţin potenţial alergen. Imunogenitatea este o proprietate dezirabilă a vaccinurilor, dar poate constitui un obstacol în terapia cu biofarmaceutice pe bază de proteine și peptide. Peptidele, polimeri compuși din până la 50 de aminoacizi, pot să apară în mod natural în organism, pot fi produse în laborator prin sinteză chimică (produse peptidice sintetice) sau prin tehnologia ADN recombinat. O varietate de peptide bioactive de origine umană, dar și de la bacterii, fungi, plante și animale posedă proprietăţi terapeutice (Wang și colab., 2022). În unele circumstanțe, impuritățile legate de peptide pot crea un potențial imunogen sau pot afecta în alt mod siguranța sau eficacitatea unui produs medicamentos peptidic.

Evaluarea imunogenității, a potenţialului alergen și modificarea antigenilor constituie etape cruciale în procesul cercetării și dezvoltării biofarmaceuticelor, înainte de a fi administrate la om. Imunogenitatea este legată de activarea imunității adaptative. Complexitatea sistemului imunitar se manifestă prin numeroase mecanisme diferite, ceea ce permite utilizarea diferitelor abordări pentru predicţia imunogenității produselor biofarmaceutice. Prin urmare, capacitatea de a provoca un răspuns imun se bazează pe două caracteristici ale medicamentului: antigenitate și imunogenitate. Toate moleculele imunogene au capacitate antigenică, dar reciproca nu este valabilă. Specificitatea antigenică este factorul implicat în imunogenitate și alergenitate, iar distincția dintre acestea permite caracterizarea tuturor tipurilor de antigeni moderni (Zhang și Tao, 2015). Interacțiunea poate depinde și de metaboliții generați, care pot fi mult mai reactivi decât medicamentul nativ, fiind uneori responsabili de sensibilizarea clinică. În administrarea medicamentelor, factorii de risc ţin atât de medicament (natura moleculelor, doza, durata, frecvenţa expunerii, ruta de administrare şi sensibilizarea încrucişată) cât şi de gazdă (vârstă, sex, factori genetici, alte afecţiuni, reacţii anterioare, sindromul alergiilor multiple).

Predicţia și modelarea profilului imunogen și alergen al moleculelor biofarmaceutice

Disponibilitatea produselor biofarmaceutice generice a crescut în ultimul deceniu și, pe măsură ce brevetele lor expiră, se apropie apariția agenților biosimilari. Primul produs aprobat în UE ca biosimilar în anul 2006 a fost Omnitrope (somatropina). Potrivit *Generics and Biosimilars Initiative* (www.gabionline.net), până în luna decembrie 2023, EMA a recomandat aprobarea a 106 biofarmaceutice biosimilare pentru utilizare în UE, din clasele de produse de tipul: 1) hormon de creștere uman; 2) factor de stimulare a coloniilor de granulocite; 3) agent de stimulare a eritropoiezei; 4) insulină; 5) hormon foliculo-stimulant; 6) hormon paratiroidian; 7) inhibitor al factorului de necroză tumorală; 8) inhibitor al factorului de creștere a endoteliului vascular și 9) anticorp monoclonal. Numărul biofarmaceuticelor biosimilare autorizate pentru comercializare în UE s-a dublat în ultimii 4 ani (Barbier și colab., 2020).

Atât compușii de referinţă din medicamentele originale, cât și substanţele biosimilare, au potențialul de a provoca un răspuns imunogen, care poate avea un impact asupra profilurilor de eficacitate și siguranţă ale medicamentului. Paradigma actuală în evaluarea imunogenității biofarmaceuticelor este orientată spre detectarea și caracterizarea anticorpilor anti-medicament generați in vivo la administrarea unui produs bioterapeutic. Cu toate acestea, multe dintre efectele adverse mediate imun pot fi determinate de formarea unor complexuri intermediare (Krishna și Nadler, 2016). Deși în multe cazuri prezența anticorpilor anti-medicament poate avea consecințe clinice reduse, există și reacţii adverse a căror frecvenţă în creștere a generat îngrijorările cu privire la potențialele consecințe clinice ale utilizării pe scară largă a produselor biofarmaceutice și biosimilare (de exemplu aplazia eritroidă) (Kessler și colab., 2006). Metodele de măsurare de laborator sunt insuficiente pentru a prezice proprietățile biologice și clinice ale produselor biofarmaceutice sau chiar pentru a compara bioechivalența acestora. Metaanalizele recente au înglobat rezultate derivate din sute de studii clinice care au vizat câteva zeci de medicamente biosimilare arătând că nu există date solide care să indice că trecerea de la un produs biologic de referință la un biosimilar este legată de orice probleme majore de eficacitate, siguranţă sau imunogenitate (Barbier și colab., 2020). Totuși, expansiunea masivă a pieţei biofarmaceuticelor și biosimilarelor deopotrivă accentuează necesitatea generării de noi cunoştinţe fundamentale și dezvoltării de metode fiabile pentru investigarea moleculelor terapeutice.

Screeningul in silico al proteinelor și peptidelor utilizează tehnici de bioinformatică și imunoinformatică ce implică abordări ale:

- Structurii primare a moleculei (secvența de aminoacizi) prin algoritmi de aliniere a secvenței, identificarea unor motive liniare conservate asociate unui potenţial imunogen/alergen, sau metode de învățare automată pentru compararea secvențelor;
- Structurii secundare și terţiare a moleculei prin abordări care compară structurile tridimensionale;
- Proprietăţilor întregii proteine prin algoritmi care utilizează proprietăţile fizico-chimice sau biochimice ale proteinelor;
- Structurii epitopilor cunoscuți ai alergenilor, spre exemplu a epitopilor compatibili cu IgE, prin algoritmi de cartografiere a acestora.

Produși biofarmaceutici foarte promiţători au eşuat în studii clinice avansate din cauza imunogenităţii nedorite. Infrastructura algoritmilor in silico permite îmbunătăţirea motivelor și modelarea peptidelor sintetice (Mattei și colab., 2021). Prin urmare, este recomandată evaluarea imunogenităţii non-clinice, care compară o peptidă sintetică cu produsul peptidic de referință. Metodele predicţiei imunogenităţii biofarmaceuticelor se bazează pe explorarea secvenţei sau a structurii moleculei, și implică algoritmi de aliniere a secvenţelor, localizare subcelulară, predicţia epitopilor recunoscuţi de limfocitele T și B, andocarea moleculară, și simulări dinamice (Doneva și colab., 2021). Aplicarea intrumentelor in silico pentru predicţia antigenității și cartografierea epitopilor în scopul dezvoltării vaccinurilor este relativ nouă (Yurina, 2022). Platformele disponibile pentru screeningul moleculelor evoluează continuu. Acestea utilizează baze de date actualizate și implică instrumente ale inteligenţei artificale precum modelări bazate pe algoritmi de învățare automată, cum ar fi *Hidden Markov Model* (HMM), *Artificial Neural Network* (ANN) și *Support Vector Machine* (SVM).

Imunogenitatea este o caracteristică a întregii macromolecule, în timp ce antigenitatea este specific determinată de anumite secvenţe ale antigenului. Regiuni limitate din macromolecula antigenică, apte să se combine cu anticorpi specifici sau cu receptorii de pe limfocitele sensibilizate se numesc determinante antigenice sau epitopi. Polizaharidele sunt antigeni T-independenţi ce pot induce sinteza de anticorpi fără intervenţia limfocitelor T. Proteinele sunt antigeni T-dependenţi, deoarece induc sinteza anticorpilor doar prin cooperarea dintre limfocitele T şi B. Constituiţi din câţiva aminoacizi, epitopii proteici sunt clasificați ca fiind continui (liniari, secvenţiali) sau discontinui (conformaţionali), în funcție de adiacenţa aminoacizilor incluși. Majoritatea epitopilor sunt discontinui și, din moment ce constau din reziduuri reunite prin plierea lanțului peptidic, reactivitatea lor antigenică depinde de conformația nativă a proteinei. Epitopii liniari sunt determinaţi de structura primară (8-30 aminoacizi), iar cei conformaţionali de structura secundară sau terţiară a moleculei proteice (juxtapoziţia în spaţiu a aminoacizilor situaţi la distanţă), modificându-se la denaturarea proteinei. Fiecare moleculă proteică reprezintă un mozaic de epitopi, fie diferiți, fie identici. Numărul de epitopi de pe o moleculă imunogenă reprezintă valenţa antigenică. Structura cuaternară a capsidelor virale dă naștere epitopilor cunoscuți sub numele de neotopi.

Conținutul în epitopi ce activează limfocitele T, unul dintre factorii ce contribuie la riscul imunogenității, poate fi măsurat relativ precis utilizând instrumente in silico. Un avantaj îl constiuie faptul că epitopii potențiali ai limfocitelor T sunt liniari, spre deosebire de epitopii recunoscuţi de receptorii celulelor B, care sunt conformaţionali. Epitopii recunoscuţi de limfocitele T, prezentați de moleculele MHC clasa I sunt de obicei peptide cu lungimea cuprinsă între 8 și 11 aminoacizi, în timp ce moleculele MHC clasa II prezintă peptide mai lungi, de 13–17 aminoacizi. Datorită polimorfismului lor, proteinele HLA se leagă la un repertoriu mare de antigeni peptidici. Structura regiunii de legare pe proteinele HLA clasa II limitează lungimea miezului peptidei de legare la nouă resturi de aminoacizi (nonamer). Prin urmare, pentru a fi recunoscută ca antigen de către sistemul imunitar, secvența unei proteine trebuie să conțină cel puțin un nonamer care se leagă de o proteină HLA clasa II. Tehnica implică următoarele etape:

- Se identifică secvența aminoacizilor în proteina de interes;
- Se obține o structură tridimensională experimentală a unui alotip al HLA selectat din baze de date sau modelat prin omologie cu cea mai similară structură;
- Se taie secvența de proteine în peptide scurte care se suprapun parţial, constând de obicei din 8 până la 20 de aminoacizi (cadre);
- Conformații multiple ale peptidei testate sunt preluate din baze de date sau prin algoritmi de modelare computerizată, generându-se o posibilă structură a complexului HLA / peptidă;
- Interacțiunea moleculară dintre peptidele scurte și moleculele HLA este evaluată prin calcularea energiei potențiale și a entropiei conformaționale a structurii complexe;
- Fiecare peptidă este clasificată după scorul calculat;
- Pe baza acestor date se construiește un profil statistic.

Algoritmii imunoinformatici pentru identificarea epitopilor sunt aplicați pentru a diminua riscul asociat proteinelor terapeutice, în urma evaluării riscului de generare a imunogenităţii nedorite. Prin calcularea densității cadrelor cu scor mare într-o proteină este posibilă estimarea scorului de imunogenitate al acesteia. În plus, pot fi identificate subregiuni de cadre cu punctaje mari sau clustere cu imunogenitate potențială. Utilizând această abordare, se poate calcula imunogenitatea clinică a unei noi proteine terapeutice (Farkas, 2021).

ACTIVITATE EXPERIMENTALĂ

Protocol de lucru

Realizaţi o fişă (document Word) cu parcurgerea punctelor de mai jos:

1. Definiţi antigenitatea şi imunogenitatea. (noţiuni din curs)

2. Ce reprezintă antigenul leucocitar uman şi care este rolul complexului major de histocompatibilitate? (noţiuni din curs)

3. Analizaţi următoarele afecţiuni: sindromul Guillain-Barré, intususcepţia, tulburarea neurologică funcţională (*functional neurological disorder*), şocul anafilactic şi sindromul DRESS. Care sunt principalele cauze ale fiecăreia dintre aceste afecţiuni? Care dintre ele pot constitui reacţii adverse la medicamente? Care dintre ele pot fi declanşate în urma vaccinării? Care dintre aceste reacţii implică un mecanism imunologic?

4. Dintre proteinele utilizate în formularea biofarmaceuticelor, un exemplu îl constituie albumina. Menţionaţi pe scurt aplicaţiile clinice ale albuminei, rolul acesteia în formularea medicamentelor, dezavantajele albuminei bovine, avantajele albuminei umane recombinate şi identificaţi aplicaţii ale acesteia (exemple de produse biofarmaceutice).

5. Screeningul in silico al albuminei:

a). Identificaţi şi descărcaţi secvenţa albuminei bovine din baza de date UNIPROT (https://www.uniprot.org/). Căutaţi termenul albumin – search. După apariţia rezultatelor, filtraţi şi selectaţi albumina bovină (coloana din stânga *Taxonomy – Filter by taxonomy* – introduceţi *Bos taurus* – căutare). Veţi obţine mai multe intrări, alegeţi spre exemplu secvenţa cu codul P02769. Derulaţi pagina, mai jos veţi găsi secvenţa de aminoacizi (Figura 22). Copiaţi secvenţa în format FASTA în documentul Word şi eliminaţi rândurile prin accesarea funcţiei *Home/Replace/Find^p/Replace all*. Verificaţi şi notaţi numărul de aminoacizi.

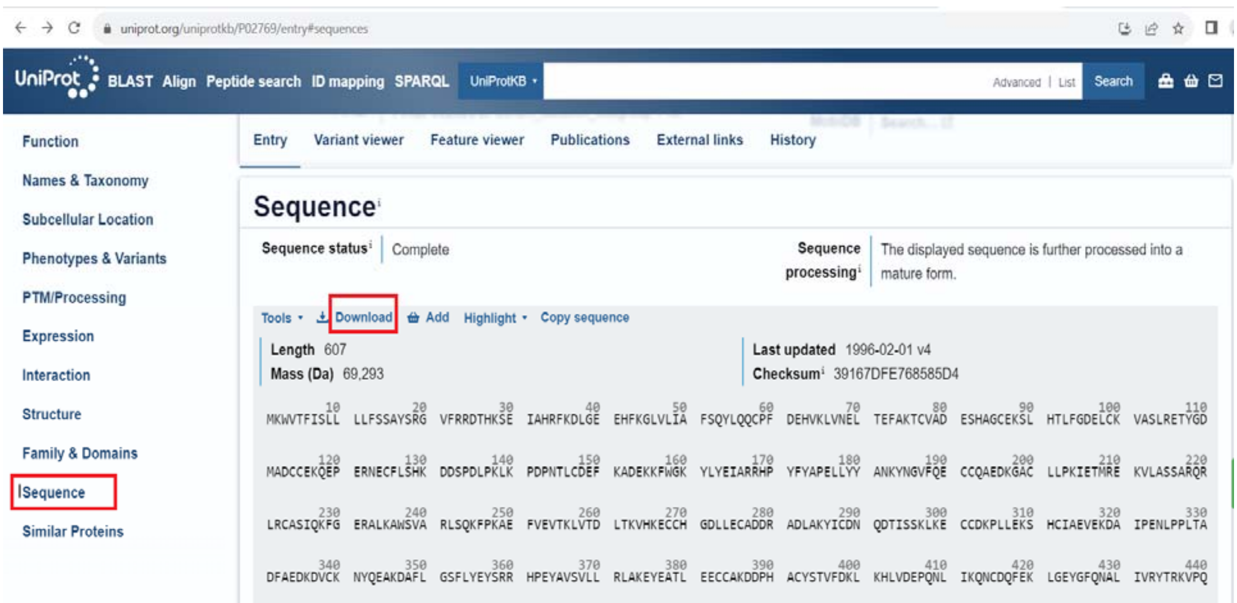
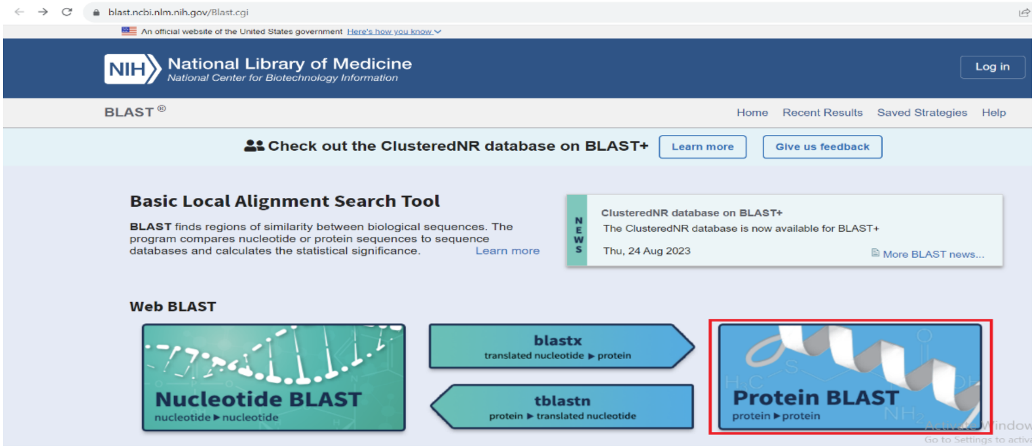


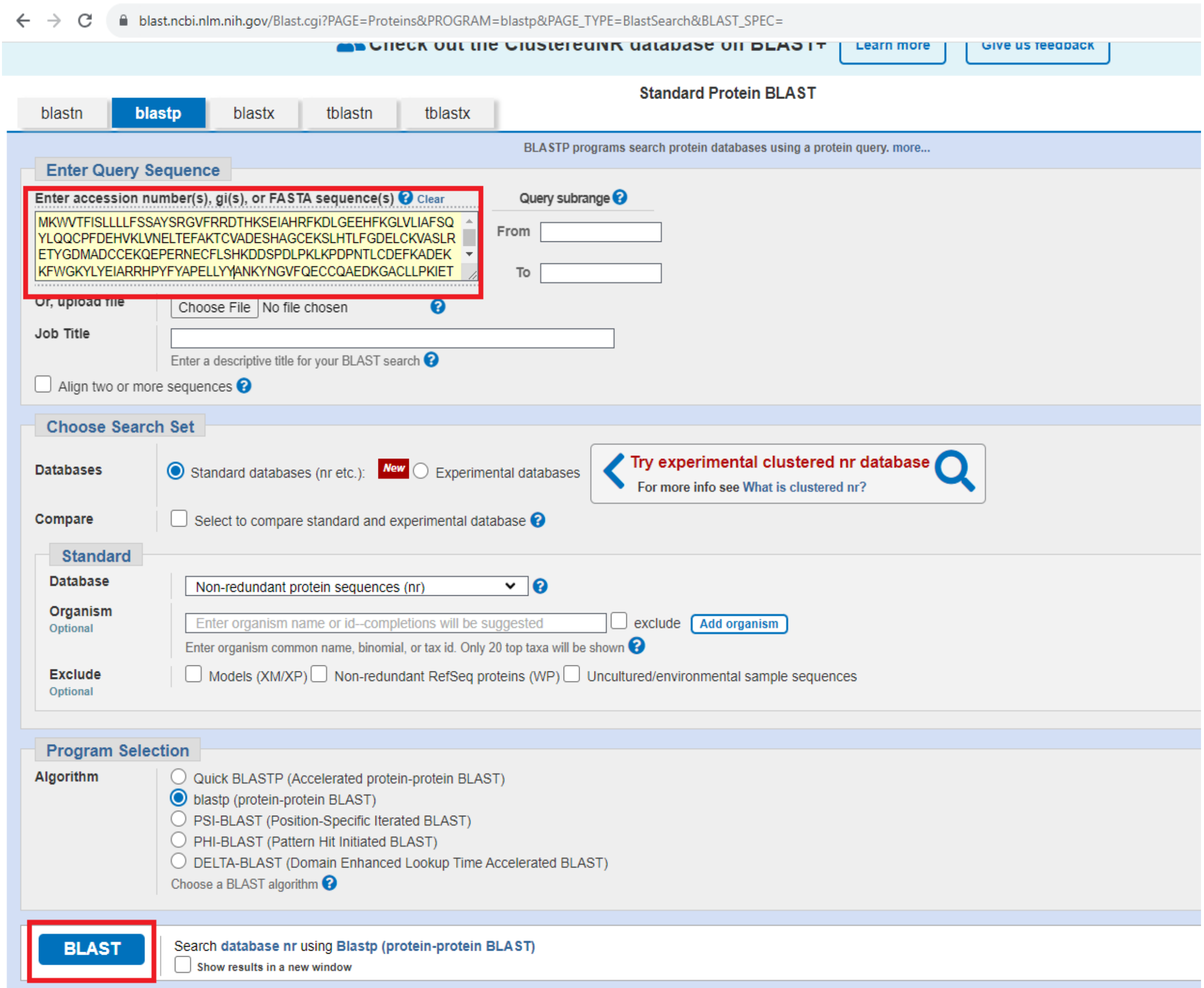
Figura 22. Secvenţa de aminoacizi a albuminei bovine în baza de date UNIPROT

b). Comparaţi secvenţa albuminei bovine cu cea a albuminei umane. Realizaţi alinierea secvenţei de aminoacizi a albuminei bovine în platforma *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) cu secvenţe din baza de date a NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (Altschul şi colab., 1990). Alegeţi

alinierea secvenţelor de aminoacizi (*Protein BLAST*) (Figura 23A), partajaţi secvenţa albuminei bovine şi efectuaţi căutarea (Figura 23B). Ordonaţi rezultatele în ordinea procentului de similaritate (Figura 24A). Derulaţi şi observaţi ce alte specii au structura primară a albuminei apropiată de cea bovină. Căutaţi printre rezultate albumina umană, utilizând opţiunea de a filtra rezultatelor (Figura 24B). Notaţi procentul de similaritate (*Per ident*) dintre secvenţa introdusă şi albumina umană (*Homo sapiens*).

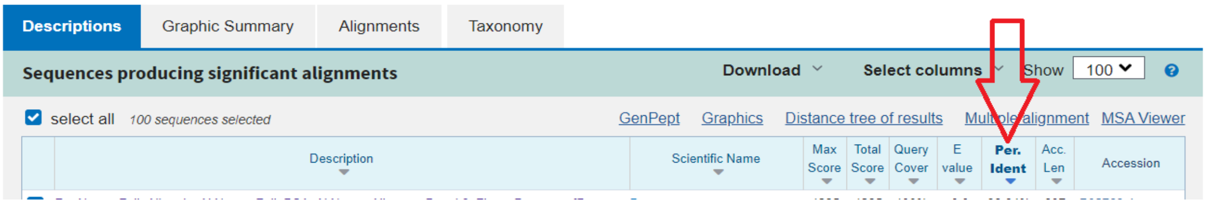


A.

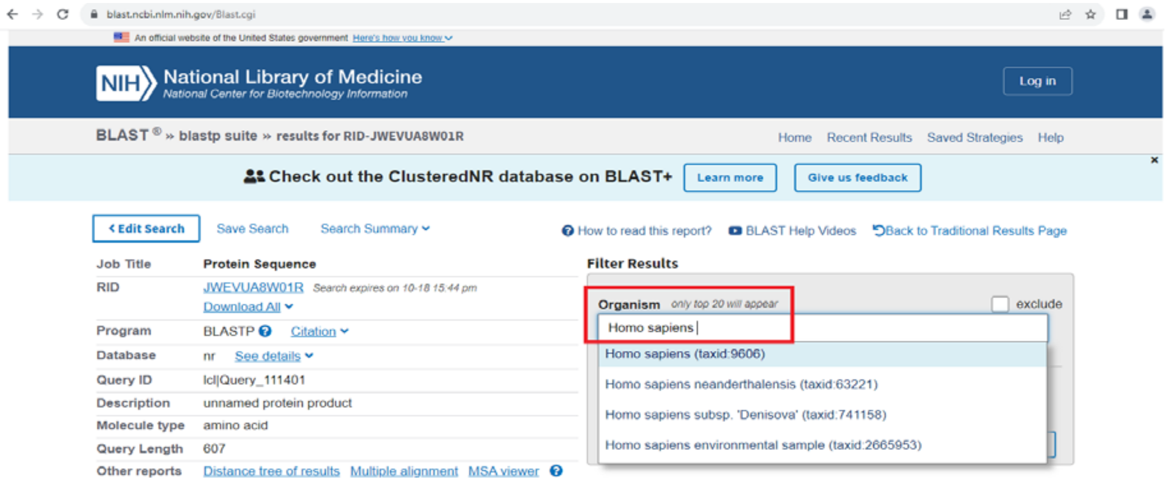


B.

Figura 23. Alinierea secvenţelor de aminoacizi în platforma BLAST. **A.** Accesarea opţiunii Protein BLAST. **B.** Introducerea secvenţei FASTA şi selectarea parametrilor.



A.



B.

Figura 24. Sortarea (**A**) şi filtrarea (**B**) rezultatelor în platforma BLAST.

Este posibil ca nicio secvenţă a albuminei umane să nu fie printre rezultatele obţinute la alinierea în platforma BLAST. Cum explicaţi acest lucru? În această situaţie, reveniţi la alinierea BLAST şi introduceţi secvenţa albuminei bovine. Căutaţi în UNIPROT secvenţa albuminei umane şi comparaţi cele două secvenţe prin Protein BLAST (Figura 25).

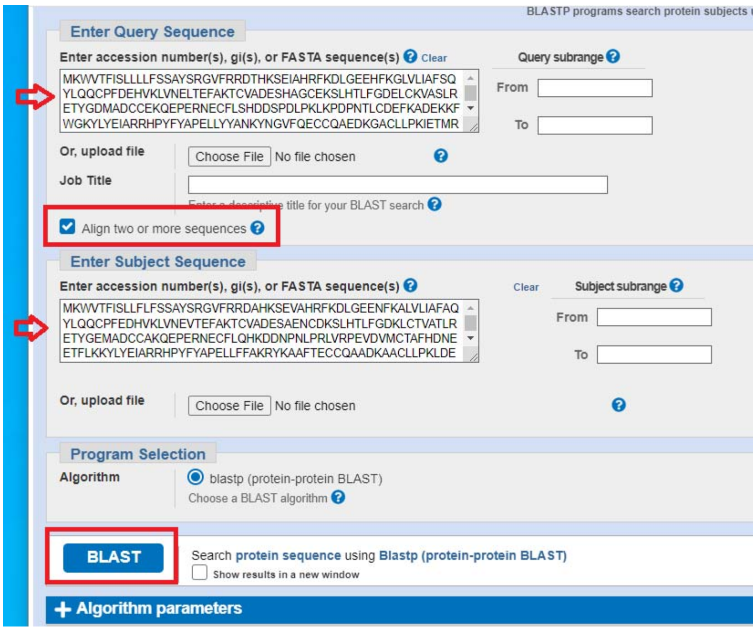


Figura 25. Model de setare a parametrilor în platforma BLAST pentru alinierea a două sau mai multe secvenţe de aminoacizi.

Notaţi procentul de similaritate obţinut. Deschideţi fereastra *Alignments* şi observaţi diferenţele. Deduceţi ce reprezintă alinierea secvenţelor de aminoacizi şi ce semnificaţie are această procedură de aranjare. Pentru ce alt tip de secvenţe este utilizat acest instrument bioinformatic şi ce aplicaţii are?

c) Predicţia epitopilor: legarea peptidelor la MHC. Efectuaţi un screening pentru a determina probabilitatea prezenţei epitopilor ce ar putea fi recunoscuţi de receptorii limfocitelor T. Utilizând platforma SYFPEITHI (http://www.syfpeithi.de/0-Home.htm) (Rammensee şi colab., 1999), selectaţi, copiaţi şi partajaţi o secvenţă de 100 de aminoacizi ai albuminei bovine în secţiunea *Epitope prediction* – bifaţi alela *HLA-DRB1*0701*, care este prezentă în toate populaţiile, şi opţiunea *all mers*, pentru a testa toate variantele de oligomeri (Figura 26). Notaţi secvenţa cu scor maxim. Din câţi aminoacizi este alcătuită? Care este scorul obţinut pentru acest epitop?

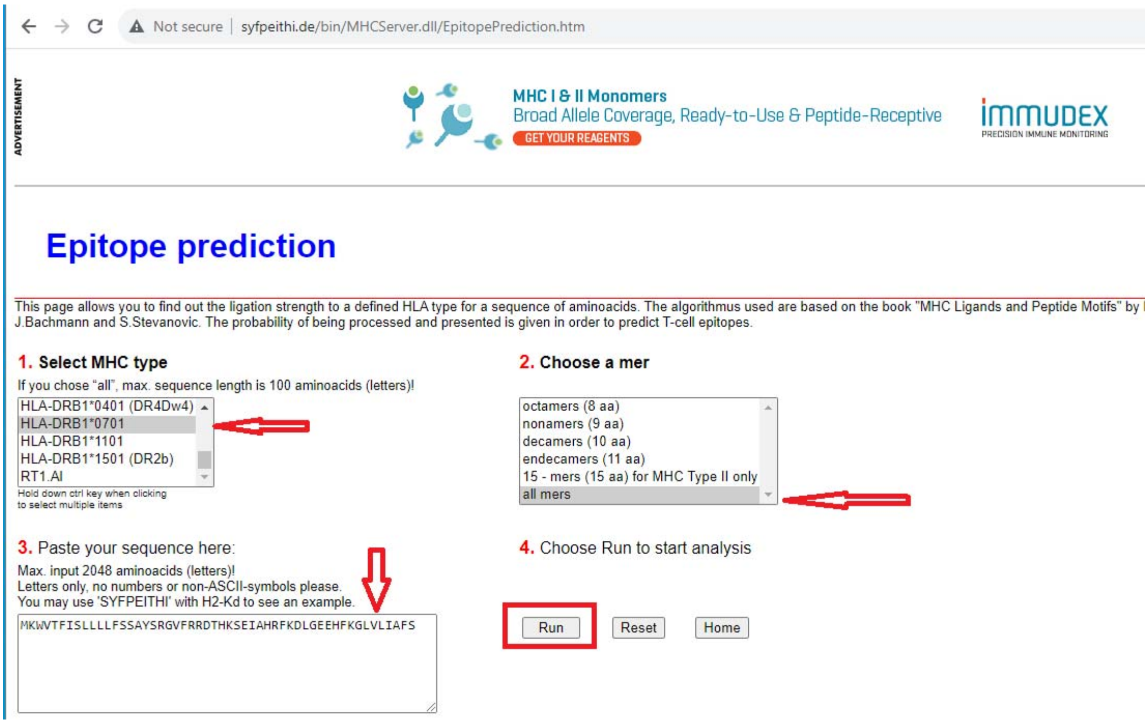


Figura 26. Predicţia epitopilor ce pot activa limfocitele T în platforma SYFPEITHI.

d) Predicţia potenţialului alergen. Efectuaţi screeningul moleculelor de albumină bovină şi umană în platforma AlgPred 2.0 (https://webs.iiitd.edu.in/raghava/algpred2/) (Saha şi colab., 2006; Sharma şi colab., 2021). Accesaţi secţiunea *Prediction* şi introduceţi întreaga secvenţă de aminoacizi a albuminei bovine (secvenţa fasta cu simbolul > şi denumirea înainte), după modelul furnizat în Figura 27. Notaţi: potenţialul alergen şi scorul obţinut, verificând disponibilitatea algoritmilor multipli. Repetaţi screeningul pentru secvenţa albuminei umane, notaţi şi comparaţi rezultatele obţinute. Realizaţi cartarea epitopilor compatibili cu IgE pentru ambele molecule. Interpretaţi rezultatele obţinute şi semnificaţia numărului de epitopi IgE pentru fiecare dintre cele două proteine.

e) Predicţia antigenităţii. Efectuaţi un screening pentru întreaga secvenţă de aminoacizi a albuminei bovine în platforma SVMTrip (http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/) (Figura 28) sau EMBOSS (https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/antigenic). Veţi primi rezultatul prin e-mail. Câte regiuni antigenice aţi detectat? Câte sunt recomandate pentru a fi investigate pentru cercetarea şi dezvoltarea unui vaccin? Care a fost scorul maxim obţinut şi pentru ce fragment?

6. Alegeţi o altă proteină terapeutică, fie de origine virală, bacteriană, umană recombinată sau oricare alta, menţionaţi aplicaţiile biofarmaceutice ale acesteia şi repetaţi paşii de la punctele 5a-e (pentru punctul 5b comparaţi secvenţa proteinei alese cu cea a moleculei native umane doar dacă nu aţi ales-o chiar pe cea umană).

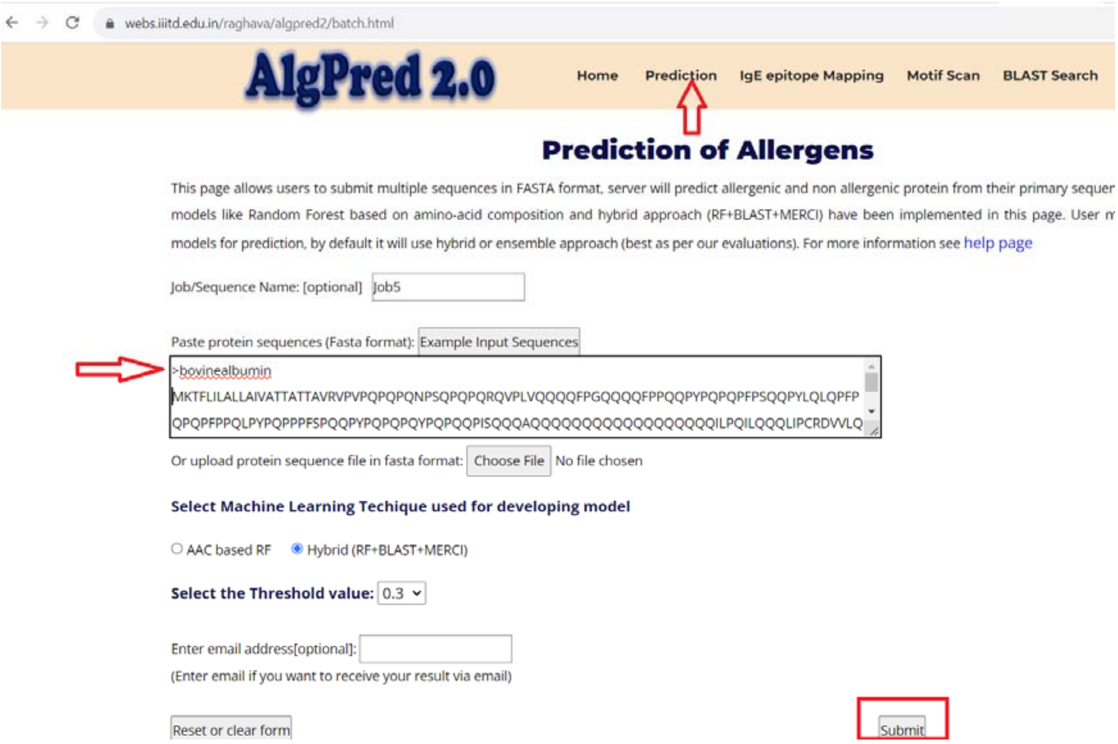


Figura 27. Model de iniţiere a predicţiei potenţialului alergen pentru albumină în platforma AlgPred 2.0

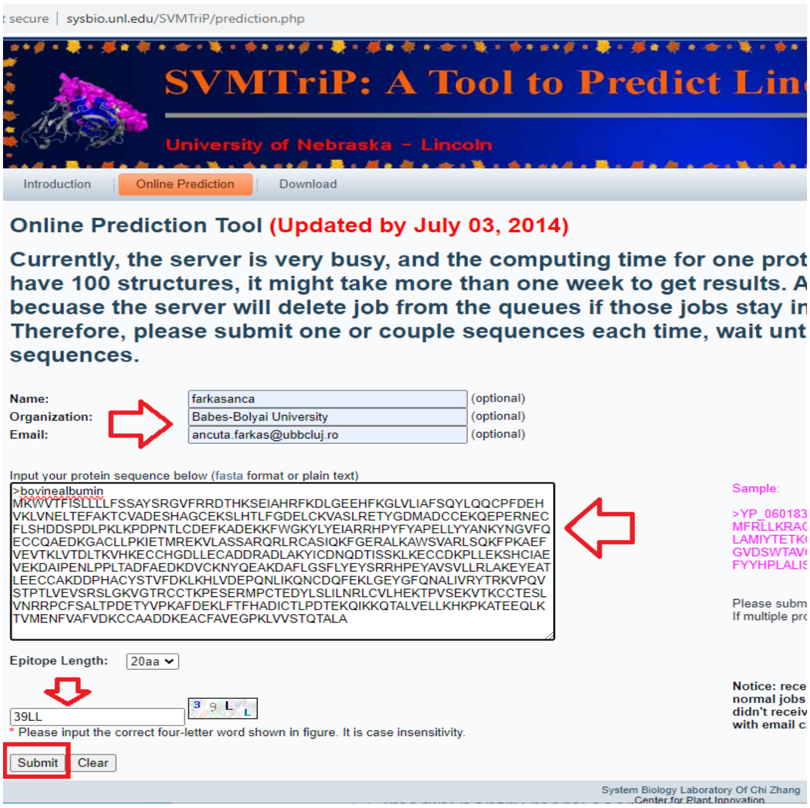


Figura 28. Model de iniţiere a predicţiei antigenităţii pentru albumină în platforma SVMTriP

Validarea în industria farmaceutică

Activităţi şi competenţe:
- Validarea în industria farmaceutică. Reglementări. Ghidurile de bune practici
- Validarea de proces. Calificarea. Atribute critice de calitate şi parametri critici
- Validarea sistemelor adiţionale
- Validarea metodei de încercare. Parametri de performanţă

Principiul lucrării

Validarea reprezintă confirmarea prin examinare şi furnizarea de dovezi obiective că sunt îndeplinite cerinţele pentru utilizarea intenţionată. În industria farmaceutică, conceptul de validare se aplică în trei mari direcţii: validarea metodei de încercare, validarea procesului şi validarea sistemelor şi procedurilor adiţionale.

Validarea în industria farmaceutică. Ghidurile de bune practici

Din punct de vedere istoric, conceperea şi implementarea unor seturi de reglementări, instituirea de organizaţii, standardizarea de metode şi armonizarea internaţională în ceea ce privește industria farmaceutică au ca obiectiv siguranţa pacienţilor. Din păcate, iniţierea demersurilor a fost motivată de tragedii care au impus o schimbare a vechilor paradigme. Originile validării în industria farmaceutică sunt plasate la începutul anilor 1970, legat de un incident din Devonport, Anglia. Un lot de flacoane cu soluţie de dextroză nu a fost sterilizat corect, iar funcţionarea defectuoasă a autoclavului nu a fost detectată. În urma administrării soluţiei contaminate, cinci pacienți au decedat. Primul „*Orange Guide*” din Marea Britanie, intitulat „*Guide to Good Pharmaceutical Manufacturing Practice*” (GMP), publicat în 1971, conţinea primele regului de bună practică. Ediția GMP lansată în 1983 includea conceptul de validare. Ulterior, eforturi internaționale au încurajat standardizarea reglementărilor. În SUA, reprezentanţii *Food and Drug Association* (FDA) recunoşteau că procesele nu erau robuste. Prezentarea „*What we see that makes us nervous*” susţinută la o conferinţă a medicamentelor parenterale a exprimat nevoia de a îmbunătăți procesele de fabricație a produselor farmaceutice (Fry, 1982). Ghidurile GMP pentru medicamente (21 CFR Parts 210 şi 211) şi dispozitive medicale (21 CFR Part 820) au fost publicate pentru prima dată în 1978 şi au inclus validarea ca termen central în anul 1983 (Margetts şi Lundsberg-Nielsen, 2021). Versiunile actuale ale ghidurilor GMP sunt disponibile pe site-ul web al FDA din SUA (https://www.fda.gov/drugs/pharmaceutical-quality-resources/current-good-manufacturing-practice-cgmp-regulations). Primul ghid GMP european a fost publicat în anul 1989, iar reglementările actuale sunt disponibile pe site-ul EMA (https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/research-development/compliance-research-development/good-manufacturing-practice). EMA a adoptat recomandările ghidurilor de calitate ale *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) (https://www.ich.org/page/quality-guidelines) privind procedurile de testare și criteriile de acceptare pentru noii produși farmaceutici. Atunci când o specificație este propusă pentru prima dată, trebuie prezentată o justificare pentru fiecare procedură și trebuie inclus fiecare criteriu de acceptare, luându-

se în considerare un interval rezonabil de variabilitate analitică și de producție așteptată. Criteriile universale pentru testare, valabile pentru noile substanţe medicamentoase/produși medicamentoși includ descrierea calitativă, identificarea (de regulă prin metode cromatografice sau spectrometrie de masă), metodele de testare (de regulă HPLC) și impurităţile. Alte teste se efectuează după caz, în funcţie de forma farmaceutică (tablete, pudre pentru reconstituire, produse parenterale), și vizează caracteristici precum: proprietăţi fizico-chimice, pH, osmolaritate, dimensiunea particulelor, forme polimorfe, substanţe chirale, conţinutul de apă, alcool, substanţe extractibile, proprietăţi reologice, uniformitatea dozelor, friabilitate, dezintegrare, solubilitate, limitele încărcăturii microbiene și germenii testaţi, conform farmacopeei, sterilitate, endotoxine/pirogene, conţinutul de conservant antimicrobian sau antioxidant etc. Aceste specificaţii se aplică substanţelor chimice (ICH, 2000). Pentru produsele biologice și biotehnologice, specificaţiile trebuie să includă testarea activităţii biologice, proprietăţile imunochimice, iar în cazul anticorpilor puritate, impurităţi, contaminanţi, și cantitatea substanţei biologice (ICH, 1999). În momentul în care cererea de autorizare este depusă autorităților de reglementare, solicitanții trebuie să fi validat în prealabil procedurile analitice utilizate în specificații, în conformitate cu ghidurile tripartite armonizate ale ICH, adoptate în UE, Japonia și SUA (ICH, 2023).

Analog implementării reglementărilor GMP în validarea de proces, validarea metodelor de încercare respectă criteriile de bună practică în laborator. Originile regulilor de bună practică în laborator, *Good Laboratory Practice* (GLP) sunt plasate tot în anii 1970, când au fost sesizate primele îngrijorări cu privire la calitatea și fiabilitatea rezultatelor laboratoarelor. Primul set de principii GLP a fost emis de către *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), în anul 1976. Principiile GLP definesc un set de reguli și criterii pentru un sistem de calitate, care se referă la procesul organizațional și condițiile în care sunt planificate, efectuate, monitorizate, înregistrate, raportate și arhivate studiile non-clinice de sănătate și siguranță a mediului (Directivele UE 9/2004 și 10/2004). Elementele cheie vizează:

a. Procedurile standard de operare (*Standard Operating Procedure*, SOP): Laboratoarele care aderă la GLP trebuie să stabilească și să documenteze SOP detaliate pentru fiecare aspect critic al operațiunilor lor, cum ar fi protocoalele de lucru, calibrarea instrumentelor și înregistrarea datelor;

b. Instalațiile și echipamentele: Laboratoarele trebuie să mențină adecvat instalațiile, echipamentele și instrumentele, pentru a efectua studii în mod eficient și pentru a minimiza riscurile de contaminare sau de contaminare încrucișată;

c. Personalul: Personalul calificat și instruit joacă un rol vital în conformitatea cu GLP. Laboratoarele trebuie să se asigure că membrii personalului posedă expertiza necesară, primesc instruire adecvată și urmează procedurile stabilite cu meticulozitate;

d. Conduita studiului: Studiile trebuie concepute corespunzător, incluzând controale adecvate, manipularea probelor, dozarea, colectarea datelor și analiza statistică. Documentarea tuturor procedurilor și observațiilor este esențială;

e. Asigurarea calității: O unitate independentă de asigurare a calității este mandatată să monitorizeze și să auditeze toate aspectele conformității cu GLP în cadrul laboratorului, ceea ce asigură că studiile sunt efectuate conform instrucțiunilor prescrise, iar datele generate sunt exacte și de încredere.

Implementarea reglementărilor GLP servește mai multor scopuri cruciale, în ceea ce privește:

a. Calitatea datelor: Orientările GLP promovează generarea de date de înaltă calitate, precise, fiabile și reproductibile, ceea ce asigură validitatea științifică și sporește credibilitatea studiilor de cercetare;

b. Protecția sănătății umane și a mediului: Reglementările GLP urmăresc în primul rând evaluarea siguranței substanțelor și a produselor chimice, laboratoarele contribuind la identificarea riscurilor potențiale și la prevenirea daunelor aduse sănătății umane și mediului;

c. Armonizare internațională: Facilitarea armonizării globale a cerințelor privind datele de siguranță minimizează barierele comerciale, reduce dublarea eforturilor și promovează schimbul eficient de informații între țări;

d. Conformitatea cu reglementările: Reprezintă adesea o condiție prealabilă pentru cererile de autorizare a noilor medicamente sau înregistrarea de noi produse, iar aderarea la GLP asigură că studiile îndeplinesc standardele necesare, crescând probabilitatea aprobărilor;

e. Încrederea publicului: Prin stabilirea unor practici de cercetare transparente și de încredere, GLP încurajează încrederea publicului în industria științelor vieții, în siguranța și eficacitatea produselor, cu beneficii atât pentru părțile interesate din industrie, cât și pentru publicul larg (della Veneria, 2023).

În prezent, principiile GMP, GLP și validării sunt adoptate de autoritățile ce reglementează industria medicamentului în întreaga lume, și cuprind o gamă largă de principii și componente concepute pentru a asigura conformitatea, calitatea și siguranţa produsului, rigoarea științifică, trasabilitatea și integritatea datelor. O serie de ghiduri în vigoare oferă suport pentru implementarea principiilor validării (EMEA 192217/2009, EMA 70278-1/2016) sau din SUA (FDA, 2011; 2015)

Utilitatea validării se dovedește indiscutabil și dincolo de asigurarea conformităţii. Accentul pus pe conformitate a redus vizibilitatea celorlalte avantaje generate de un program de validare solid. Activități de validare și asemănătoare validării, reglementate și nereglementate, se regăsesc într-un număr de industrii. Domeniul bancar, aviația, industria software, microelectronica, energia nucleară, apa potabilă printre altele, toate încorporează practici care seamănă foarte mult cu validarea din industria farmaceutică. Similar validării, analiza riscurilor și punctele critice de control (*Hazard Analysis and Critical Control Points* sau HACCP) este o abordare preventivă sistematică a siguranței alimentelor împotriva pericolelor biologice, chimice și fizice, care ar putea determina ca produsul finit să nu fie sigur pentru consumator. Conceptul HACCP implică tot lanţual alimentar, de la materia primă, producţie și distribuţie, până la consum. Totodată, abordarea bazată pe identificarea riscurilor asociate punctelor critice proiectează măsuri pentru a reduce aceste riscuri la un nivel sigur. Nu este deloc surprinzător faptul că astfel de activități de verificare pentru produse, procese și sisteme au utilitate și în alte domenii, în afara industriei farmaceutice.

Validarea este un program definit care, în combinație cu metode de producție de rutină și tehnici de control al calității, oferă o asigurare documentată că un sistem funcționează conform intenției și/sau că un produs este conform cu specificațiile sale predeterminate și atributele de calitate. Validarea reprezintă confirmarea prin examinare şi furnizarea de dovezi obiective că sunt îndeplinite cerinţele pentru utilizarea intenţionată. Motivația principală de a urma liniile directoare în validarea farmaceutică este aceea că este cea mai cunoscută metodă de a asigura o calitate constantă a produsului și, prin urmare, siguranța consumatorilor, atunci când verificarea directă nu este posibilă. Abordarea din perspectiva validării urmează un plan prestabilit, bazat pe prevenţie și corectare a erorilor: se stabilesc specificaţiile produsului, se realizează studiile/testele, se evaluează rezultatele și se iau măsuri corective acolo unde este cazul. În industria farmaceutică, cele trei componente majore ale validării sunt:

1. Validarea procesului: procesul de fabricaţie asigură producerea în mod constant a unui produs ce îndeplineşte criterii de calitate conform unor specificaţii predeterminate;

2. Validarea sistemelor și procedurilor adiţionale: sistemele și procedurile ce susţin procesul tehnologic funcţionează la parametrii specificaţi (calitatea sursei de apă, a aerului, curăţenia etc.);

3. Validarea metodei de încercare: procesul prin care laboratorul verifică dacă metoda este adecvată scopului în care va fi utilizată şi este aplicată corect, furnizând rezultate fiabile.

1. Validarea procesului se referă la stabilirea dovezilor documentate care oferă un grad înalt de asigurare că un anumit proces va produce în mod constant un produs care îndeplinește specificațiile predeterminate și atributele de calitate. Conform reglementărilor în vigoare, validarea de proces constă într-o suită de etape, concepute și derulate într-o abordare bazată pe riscuri: designul procesului, calificarea și validarea procesului și a echipamentelor și verificarea continuă a acestora (Tabelul 4).

Tabelul 4. Etapele validării de proces conform reglementărilor din SUA și UE

Etapa	SUA	UE
A.	Designul procesului	Dezvoltarea farmaceutică sau designul procesului
B.	Calificarea procesului	Calificarea și validarea
B.1	Calificarea echipamentelor şi a utilităţilor	Calificarea echipamentelor Calificarea instalării Calificarea operaţională Calificarea performanţelor
B.2	Calificarea performanţelor procesului	Validarea procesului: tradiţional, continuu, hibrid
C	Verificarea continuă a procesului	Verificarea procesului în derulare

1.A. Dezvoltarea farmaceutică sau designul procesului (*Design Qualification*, DQ), se referă la validarea infrastructurii. Proiectarea, construcția și punerea în funcțiune a unei noi fabrici, secţii sau instalații pentru industria farmaceutică este un proces complex, interdisciplinar, care implică ingineria, tehnologia și controlul calităţii. Proiectarea procesului poate trece printr-o serie de faze diferite, de la concepere și studiu de fezabilitate, până la proiectarea finală detaliată a construcţiilor, punerea în funcțiune și activitățile finale de validare a sitului. Fiecare sit de producţie deţine un plan general de validare, iar accentul este pus pe respectarea normelor GMP pentru asigurarea calităţii produsului. Designul procesului implică totodată o listă detaliată a utilităţilor și echipamentelor, cu specificaţiile tehnice de rigoare, și un plan de achiziţii. De altfel, planificarea este foarte importantă în industria farmaceutică și toate activităţile trebuie să respecte cu stricteţe un calendar prestabilit.

1.B. Activităţile de calificare sunt separate în două mari categorii: calificarea echipamentelor și validarea proceselor. Calificarea echipamentelor, subdivizată în calificarea la instalare (*Installation Qualification*, IQ), operaţională (*Operational Qualification*, OQ) și a performanţelor (*Performance Qualification*, PQ), este axată pe echipamentul de prelucrare a produsului. În prima etapă predomină un exercițiu de documentare, în care detaliile componentelor fizice ale sistemului sunt înregistrate ca definiție a echipamentului, apoi sunt stabilite și verificate capacitățile operaționale ale echipamentului și utilităţilor, iar testarea performanţelor tuturor sistemelor implicate, care sunt utilizate pe intervale extinse de timp, se aplică cu o frecvenţă periodică. Validarea procesului confirmă acceptabilitatea produsului fabricat prin intermediul echipamentului și se bazează în mare măsură pe rezultatele testelor fizice, chimice și microbiologice ale probelor.

Spre exemplu, o unitate de producţie ce implică sisteme de umplere aseptică poate identifica echipamente ce necesită calificare: autoclav, unităţi de spălare şi sterilizare a dopurilor, a flacoanelor, a tăvilor, etuvă, sticlărie, tunel de sterilizare cu aer cald, unitate de umplere şi închidere cu dopuri, unitate de liofilizare, linie de inspecţie, etichetare, ambalare primară. După identificarea sistemelor care urmează a fi calificate, se elaborează un plan de calificare, iar protocolul va conține următoarele:

- O definiție clară a scopului
- Un plan de execuție
- Cine va executa calificarea
- Cum se va desfășura calificarea
- Ce proceduri sunt necesare
- Criterii de acceptare
- Metode definite pentru înregistrarea rezultatelor
- O evaluare finală a acceptării
- Mijloace de certificare a calificării

Prin urmare, nu doar identificarea echipamentelor este necesară, ci și elaborarea unui plan de activităţi de calificare şi validare ce implică fiecare sistem în parte, dar și a unui set de proceduri standard, destinate fiecărui echipament: SOP pentru operare, SOP pentru trainingul personalului, SOP pentru pentru curăţare şi SOP pentru întreţinere. Se concep instrucţiunile de lucru în raport cu operaţiunile care se vor executa şi adapate fiecărui produs. Este de asemenea necesară validarea sistemelor informatice (*Computer System Validation*, CSV), întrucât acestea sunt parte integrantă din proces. Nivelul de validare necesar este prestabilit şi documentat, iar în acest scop matricile de trasabilitate sunt foarte utile. Un astfel de exemplu al unei matrici de validare pentru echipamentele dintr-o unitate de umplere aseptică este ilustrat în Tabelul 5 (Adamson, 2008). Trebuie menţionat că acest exemplu prevede CSV pentru echipamentele conectate la calculator la timpul respectiv. Industria farmaceutică a evoluat imens odată cu revoluţia tehnologiei, iar din perspectiva validării probabil că CSV a făcut cele mai mari progrese. Sistemele informatice au fost introduse în toate compartimentele de cercetare şi producţie, un salt imens reprezentând trecerea de la validarea manuală la cea digitală. Prin urmare, CSV este esenţială pentru a asigura că toate sistemele informatice utilizate în procesele farmaceutice sunt fiabile, precise şi conforme cu standardele în vigoare. În perspectivă, algoritmii de învăţare automată, inteligenţa artificială şi soluţiile bazate pe cloud vor îmbunătăţi conformitatea, eficienţa, gestionarea riscurilor şi costurile legate de validare.

1.C. Verificarea procesului în derulare. Întrebarea frecventă este „Când este finalizată calificarea/validarea?” Procesul nu este finit, ci este un exercițiu în curs de desfășurare, deoarece instalațiile, serviciile, echipamentele și procesele sale trebuie să fie întotdeauna într-o stare de validare pentru a se conforma cu cerințele de reglementare. Controlul schimbărilor se aplică nu numai proceselor de producție în curs, ci și pe întregul proiect. Domeniul de aplicare și amploarea verificării continue a procesului sunt influențate de o serie de factori, printre care:

- Cunoștințe anterioare de dezvoltare și fabricație din produse și/sau procese similare;
- Gradul de înțelegere a procesului dobândit din studii de dezvoltare și experiența de producție;
- Complexitatea produsului și/sau a procesului de fabricație;
- Nivelul de automatizare a proceselor și tehnologiile analitice utilizate;
- Pentru produsele vechi, cu referire la ciclul de viață al produsului, robustețea procesului și istoricul de la fabricație la punctul de comercializare, după caz.

Tabelul 5. Extras dintr-o matrice de validare pentru echipamentele dintr-o unitate de umplere aseptică (după Adamson, 2008).

Echipament	**Validare**	**Instrucţiuni de operare**	**DQ**	**Criterii de acceptare**	**IQ**	**Calibrare**	**OQ**	**SOP operare**	**SOP curăţenie**	**SOP întreţinere**	**SOP training**	**CSV**
Spălător flacoane	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Spălător dopuri	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Flacoane	✓	✓	✓		✓	✓			✓	✓		
Filtre	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Unitate umplere	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Cuptor depirogenare	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
Imprimantă etichete	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
Sistem apă injectabile	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
Generator abur	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Omogenizator	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Unitate liofilizare	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
Unitate umplere	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
Unitate închidere dopuri	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Unitate umplere tuburi	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Inspecţie flacoane	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Spălător echipament												
Balanţă	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
pH-metru	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		

Atribute critice de calitate și parametri critici. Validarea procesului tehnologic urmăreşte stabilirea parametrilor operaţionali astfel încât calitatea seriilor/loturilor fabricate să fie constantă şi corespunzătoare standardului de fabricaţie a produsului finit. Validarea procesului tehnologic debutează cu identificarea atributelor de calitate ale produsului. Un atribut critic de calitate reprezintă o proprietate sau caracteristică fizică, chimică, biologică sau microbiologică care ar trebui să se încadreze într-o limită, un interval sau o distribuție corespunzătoare pentru a asigura calitatea dorită a produsului. Pentru fiecare atribut critic de calitate se identifică cel puţin un parametru critic, stabilindu-se metodele de analiză și valorile limită acceptate. Un parametru critic reprezintă acel parametru de proces a cărui variabilitate are un impact asupra unui atribut critic de calitate și, prin urmare, ar trebui monitorizat sau controlat pentru a se asigura că procesul produce calitatea dorită. Protocolul de validare specifică: parametri de monitorizat pe flux, parametri critici şi limitele acestora, formule de calcul a randamentului și responsabilităţile compartimentelor.

Validarea procesului este în strânsă legătură cu validarea sistemelor și proceselor adiționale, dar și cu validarea metodelor de încercare. Parametrii critici identificaţi necesită verificare prin testare și valori limită pentru acceptare. Validarea include o justificare a metodelor de testare alese,

demonstrând că încercările sunt adecvate scopului propus și stabilește criterii de performanţă pentru metodele de încercare. Există patru tipuri de abordări ale testării produsului în procesele industriale:

- *Inline:* Produsul este analizat în timp real, direct în timpul procesului de producţie. Dispozitivele inline sunt integrate direct în fluxul de proces și efectuează măsurători continue fără a întrerupe fluxul. Acest lucru oferă avantajul feedback-ului instantaneu și capacitatea de a ajusta rapid procesul dacă sunt detectate abateri;
- *Online:* Similar monitorizării inline, eșantionarea și analiza online au loc în timp ce procesul rulează, dar probele sunt de obicei prelevate din fluxul procesului și transportate la un analizor situat în imediata apropiere. Analizele online pot fi efectuate continuu sau la intervale stabilite;
- *Atline*: Se referă la situațiile în care probele sunt prelevate din proces și testate la un analizor care nu este situat direct la procesor, dar este în apropiere (de exemplu, într-un laborator din cadrul unității de producție). Analizele atline sunt de obicei efectuate la intervale regulate și nu continuu.
- *Offline*: Implică prelevarea de probe din proces și transportarea acestora la un laborator aflat la distanță, unde sunt analizate. Acest lucru poate dura ceva timp și, prin urmare, rezultatele nu sunt disponibile imediat pentru a influența procesul. Cu toate acestea, analizele offline pot oferi adesea mai multe detalii și acuratețe.

Validarea nu este doar un proces intern al producătorului, ci o cerinţă a autorităţilor, iar documentaţia întocmită conform reglementărilor în vigoare se depune în vederea obţinerii autorizaţiei de comercializare a medicamentelor. Conform ghidului privind validarea procesului pentru produsele finite al EMA, schema de verificare continuă a procesului trebuie să fie prezentă în dosarul autorizației de introducere pe piață și ar trebui să includă, după caz, următoarele informații privind monitorizarea propusă:

- Detalii privind monitorizarea on-line/in-line/at-line, inclusiv parametrii testați, numărul de probe, dimensiunea probelor și frecvența monitorizării;
- Detalii despre metode analitice;
- Criterii de acceptare;
- Informații și date, inclusiv, după caz, despre modele statistice sau instrumente utilizate pentru a determina dacă datele de verificare continuă susțin capacitatea procesului și a controalelor de a produce un produs reproductibil la scară comercială;
- Dacă a fost dezvoltat un design de proces, modul în care monitorizarea propusă va contribui la verificarea spaţiului proiectat (EMA/CHMP/CVMP/QWP/749073/2016).

2. Validarea sistemelor și procedurilor adiţionale. Utilitățile din unitățile de producţie farmaceutică includ gaze (aer comprimat, azot, oxigen și dioxid de carbon), lichide (apă de proces și solvenți), abur (proces și curățare), sisteme de vacuum, instalaţii electrice și canalizare (proces și deșeuri). În cadrul facilităţilor de producţie pot exista și alte utilităţi, iar procesele de validare pot fi identice sau similare. O serie de studii de impact sunt necesare pentru a a determina ce tipuri de utilități sunt critice pentru proces, care sunt marginale și care sunt în afara domeniului de calificare. Utilitățile utilizate în producție, indiferent de tipul produsului (medicamente finite, ingrediente active farmaceutic, produse biologice, solide, lichide, creme, unguente sau produse sterile), sunt analizate din perspectiva critică. Răspunsurile la un set de întrebări pot stabili dacă aceste utilităţi necesită validare sau doar punere în funcţiune:

- Este utilitatea implicată în activităţi reglementate GMP?

- Au utilitatea sau produsul ei contact direct cu produsul sau cu ambalajul primar?
- Produsul direct al utilităţii este utilizat în imediata vecinătate a produsului expus?
- Sunt utilitatea sau produsul ei utilizaţi în etapele finale de curăţenie?
- Sunt utilitatea sau produsul ei utilizaţi în procese de sterilizare și igienizare?
- Au operarea sau controlul utilității impact direct asupra atributelor critice de calitate ale produsului sau a parametrilor critici de proces?

Orice răspuns afirmativ indică faptul că utilitatea necesită validare (Maynard, 2008). Procesul de validare parcurge aceleaşi etape de calificare și validare ca și în cazul validării de proces: DQ, IQ, OQ, PQ, CSV.

Să considerăm spre exemplu un proces de fabricaţie al produselor farmaceutice sterile. Atributele critice de calitate ale produsului finit de tipul soluţie perfuzabilă implică:

- Sterilitatea
- Apirogenitatea
- Absenţa particulelor
- Natura izotonică
- Compatibilitatea
- Stabilitatea
- Siguranţa

Primul atribut critic de calitate al produsului este sterilitatea. Sterilitatea poate fi definită ca lipsa microorganismelor viabile. Pentru a asigura sterilitatea, producătorii farmaceutici trebuie să utilizeze tehnici de procesare aseptică și să utilizeze materiale sterile. Conform GMP, sunt stabilite metode stricte de fabricaţie și proceduri riguros stabilite și validate. Sterilitatea nu trebuie să se bazeze exclusiv pe un proces terminal sau pe un test al produsului finit. Sterilitatea este un atribut complex ce necesită atât validare de proces cât și a metodelor de încercare și de asemenea validarea curăţeniei. Cele mai mari provocări cu care se confruntă producătorii acestor forme de dozare sunt menținerea sterilității pe parcursul producției, distribuției și utilizării. Produsele sterile sunt fabricate într-un mediu cu măsuri stricte de control al curățeniei, respectând principiile de proiectare a camerelor curate, beneficiind de sisteme de control al aerului în proces, sisteme de alimentare cu aer filtrat, procese automate robotizate pentru toate etapele. Procesarea aseptică presupune un set de proceduri utilizate pentru a preveni contaminarea microbiană a produselor. Aceste proceduri includ sterilizarea echipamentelor și materialelor, menținerea curățeniei în mediul de producție, prevenirea contaminării încrucișate și efectuarea de audituri regulate (Devulapalli, 2022). Materialele sterile sunt cele care au fost sterilizate pentru a elimina toate microorganismele viabile, și pot include componente de ambalare, medii de filtrare și produse finite. Identificarea surselor ce pot genera neîndeplinirea condiţiilor de sterilitate:

- Facilitățile de fabricaţie
- Utilitățile (apă, abur, gaze comprimate)
- Echipamentele
- Personalul
- Mediul din incinte
- Tratarea aerului
- Curățarea și igienizarea

- Calitatea materiilor prime
- Sarcina biologică de prefiltrare
- Metodele de sterilizare a articolelor utilizate la fabricarea produselor sterile
- Filtrarea
- Testarea sterilităţii și a endotoxinelor
- Întreținerea instalațiilor și echipamentelor

Validarea se adresează tuturor echipamentelor, operaţiilor și utilităţilor ce pot genera neîndeplinirea condiţiilor de sterilitate, dar și metodelor de încercare. Conform standardului ISO 14644-1:2015 privind zonele curate, acestea sunt clasificate în patru clase de curăţenie (A-D). Metodele de testare a calităţii aerului se bazează pe numărarea de particule și estimarea aeromicroflorei. Clasificarea conform numărului de particule permis în starea de repaus și în timpul operării este redată în Tabelul 6. Dacă limitele maxim admise sunt depășite, se aplică măsurile corective prevăzute în SOP pentru monitorizarea claselor de curăţenie și a dispozitivelor pentru aer curat. Validarea prevede de asemenea metodele de verificare și testare a sterilităţii. Testele aplicate în vederea testării sterilităţii pot fi online sau atline, calitative (de tipul pozitiv/negativ) sau cantitative (ce implică metode microbiologice de cuantificare a germenilor).

Tabelul 6. Numărul maxim admis de particule pentru fiecare clasă de curăţenie

Clasa	**Număr maxim admis de particule/m^3**			
	Stare de repaus		**Stare de operare**	
	≥ 0,5 µm	**≥ 5 µm**	**≥ 0,5 µm**	**≥ 5 µm**
A	3.520	20	3.520	20
B	3.520	29	352.000	2.900
C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
D	3.520.000	29.000	nedefinit	nedefinit

3. Validarea metodei de încercare vizează fiecare test din controlul calităţii și reprezintă procesul prin care laboratorul îşi stabileşte caracteristicile de perfomanţă şi limitele metodei şi prin care identifică factorii care influenţează aceste caracteristici, precum şi gradul de influenţă al acestor factori. Validarea este o procedură care asigură că o metodă de încercare este cât se poate de demnă de încredere. Acest proces de verificare a metodei constă dintr-un program de validare a metodei care răspunde la întrebarea: „Cât de precisă este metoda în mâinile utilizatorului final?”.

În industria farmaceutică, validarea metodelor de încercare este strâns legată de validarea procesului, întrucât parametrii critici identificaţi necesită verificare prin testare. Validarea include o justificare a metodelor de testare alese, demonstrând că încercările sunt adecvate scopului propus și stabilește criterii de performanţă pentru metodele de încercare. În momentul în care cererea de autorizare pentru un nou medicament este depusă la autorităţi, dosarul include validarea procedurilor analitice utilizate în specificații, în conformitate cu ghidurile tripartite armonizate (ICH, 2023).

Similar implementării principiilor validării de proces în alte ramuri industriale, validarea metodelor de încercare, consacrată în industria farmaceutică, a fost implementată și în alte laboratoare, devenind o cerinţă esenţială a acreditării. O serie de reglementări internaţionale și naţionale ghidează compartimentele responsabile în implementarea validării. Dintre acestea,

standardul internaţional ISO/IEC 17025:2017 stabilește criteriile generale pentru competenţa laboratoarelor de încercări şi etalonare, iar noua serie de standarde ISO 16140 este dedicată validării și verificării metodelor microbiologice, cu aplicare în lanţul alimentar (ISO 16140-1:2016).

Realizarea unui protocol de validare a metodei de încercare implică instrucţiunile de lucru privind operaţia de validare în laborator și premisele validării: identificarea responsabililor de validare, definirea metodei pentru care se aplică, menţionarea standardelor de metodă şi a documentaţiei de referinţă, enumerarea echipamentelor de măsurare, a consumabilelor, a materialelor de referinţă certificate, precum și a condiţiilor de mediu necesare realizării încercării. Validarea debutează cu identificarea parametrilor de performanţă ai metodei, care urmează a fi evaluaţi, în funcţie de specificul metodei:

- *Selectivitatea sau specificitatea:* Reprezintă abilitatea metodei de a diferenţia şi măsura analiţi în prezenţa interferenţilor ce pot să fie prezenţi în probă, oferind informaţii despre soliditatea metodei;
- *Stabilitatea şi robusteţea:* Se referă la capacitatea unei metode analitice de a rămâne neafectată de variaţii mici, dar deliberate ale parametrilor metodei: stabilitatea variaţiei în timp a substanţei analizate din matrice, respectiv sensibilitatea unei metode analitice la variaţia condiţiilor experimentale ce pot influenţa rezultatul;
- *Exactitatea sau acurateţea*: Reprezintă eroarea sistematică exprimată ca diferenţa dintre valoarea medie a unui număr de determinări repetate şi valoarea adevărată;
- *Liniaritatea:* Indică abilitatea acesteia de a oferi rezultate proporţionale concentraţiei analizantului prezent în probă, într-un anumit domeniu;
- *Precizia:* Indică eroarea aleatoare şi reprezintă dispersia rezultatelor faţă de o valoare medie;
- *Repetabilitatea*: Arată precizia între determinări efectuate în cadrul aceluiaşi laborator, utilizându-se acelaşi analit şi acelaşi echipament;
- *Reproductibilitatea:* Indică precizia între determinări, prin analiza mai multor replici, în condiţii (laboratoare) diferite;
- *Incertitudinea de măsurare*: Este parametrul asociat rezultatului unei măsurări, care caracterizează împrăştierea valorilor ce în mod rezonabil ar putea fi atribuite măsurandului.

După stabilirea parametrilor de performanţă ce urmează a fi demonstraţi, protocolul de validare descrie modalitatea execuţiei experimentale și stabilește criteriile de acceptabilitate în conformitate cu legislaţia aplicabilă. După executarea încercărilor, rezultatele sunt prezentate și prelucrate, iar raportul de validare menţionează concluziile privind satisfacerea fiecărei cerinţe şi declaraţia privind validitatea metodei. O fișă de validare centralizează rezultatele și concluziile obţinute la fiecare rundă de validare.

Vom considera spre exemplu realizarea unui protocol de validare pentru o metodă de încercare. Datorită aplicabilităţii largi a validării, ne vom orienta către apa potabilă, imaginând un protocol de validare pentru identificarea şi numărarea enterococilor. Metoda standard se bazează pe filtrarea prin membrană şi constă în două etape: izolarea primară a coloniilor caracteristice prin incubarea membranei pe mediul de cultură selectiv Slanetz Bartley agar, urmată de confirmarea enterococilor prin transferul membranei pe mediul de confirmare agar cu bilă și esculină. Procedura specifică a laboratorului descrie detaliat scopul metodei și aplicabilitatea acesteia, incluzând detalierea necesarului, a pașilor de execuţie, a modului de interpretare a rezultatelor, a responsabilităţilor și înregistrărilor. În exemplul de mai jos vor fi menţionate doar aspectele de conţinut a protocolului de validare, detaliind aspectele legate de parametrii de performanţă ai metodei.

PROTOCOL DE VALIDARE

Identificarea şi numărarea enterococilor. Metoda prin filtrare pe membrană

1. **Data:**

2. Responsabili:

3. Metoda de analiză:

- ISO 7899-2:2000 *Water quality — Detection and enumeration of intestinal enterococci. Part 2: Membrane filtration method*
- Procedura specifică a laboratorului

4. **Documentaţie de referinţă:**

- Instrucţiuni de lucru pentru validarea metodelor de încercare în laboratorul de analize microbiologice

5. Echipamente de măsură:

- Echipamente de încercare/măsurare (producător, model, an de fabricaţie):

- Agitator magnetic cu funcţie de plită
- Sistem de filtrare cu pompă vid
- Incubator/Incubatoare
- Etuvă sterilizatoare
- Numărător de colonii
- Autoclav/Autoclave
- Balanţă tehnică
- Hotă microbiologică, clasa II de siguranţă
- pH-metru

- Alte echipamente:

- Frigider pentru păstrarea probelor
- Frigider pentru păstrarea mediilor de cultură
- Frigider pentru păstrarea tulpinilor de referinţă

- Sticlărie şi consumabile de laborator:

- Membrane filtrante pentru analiza microbiologică, sterile, porozitate 0,45 µm
- Cutii Petri cu diametrul de 60 mm de plastic, sterile
- Anse de plastic sterile
- Cilindri gradaţi de 100 (±0,5), 500 (±2,5) şi 1000 (±5,0) ml
- Baloane cu fund plat de 500, 1000 şi 6000 ml
- Vase Erlenmeyer de 300 şi 2000 ml
- Flacoane gradate cu capac autoclavabil
- Eprubete cu dop autoclavabil

- Medii de cultură și reactivi (producător, lot, data recepţiei, data expirării):

- Mediu de cultură Slanetz Bartley agar cu clorură de trifeniltetrazoliu, pulbere deshidratată
- Mediu de cultură agar cu bilă și esculină, pudră deshidratată

6. **Materiale de referinţă:**

- Tulpini de referinţă certificate (producător, lot, data recepţiei, data expirării):

- tulpina *Enterococcus faecalis* ATCC 19433
- tulpina *Escherichia coli* ATCC 8739

7. Condiţii de mediu:

Specifice laboratorului de microbiologie.

8. Indicatori de performanţă:

8.1. Parametrul de performanţă: Selectivitate/specificitate

Pentru confirmarea acestui parametru de performanţă se urmărește puterea de discriminare a mediilor de cultură Slanetz Bartley agar şi agar cu bilă și esculină între microorganismul ţintă (tulpina de referinţă *Enterococcus faecalis* ATCC 19433) şi microorganismul neţintă (*Escherichia coli* ATCC 8739). Prin incubarea la temperatura de 37°C și respectiv 44°C, aceste medii de cultură sunt utilizate pentru detectarea enterococilor intestinali.

Criterii de performanţă: Creşterea microorganismului ţintă, absenţa creşterii microorganismelor neţintă și pe martorul negativ.

Experimente: Inocularea mediilor Slanetz Bartley agar şi agar cu bilă și esculină cu tulpinile de referinţă utilizate în laborator.

Evaluarea rezultatelor: prezenţa sau absenţa coloniilor tipice.

Criterii de acceptare: *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 – creştere specifică; *Escherichia coli* ATCC 8739 – absenţa creşterii specifice; Martor negativ – absenţa creşterii.

8.2. Parametrul de performanţă: Stabilitate/robusteţe

Se urmăreşte sensibilitatea metodei analitice de determinare a enterococilor la variaţiile condiţiilor experimentale, ce pot fi exprimate ca o listă de: materiale de analizat, substanţe analizate, condiţii de preparare a probelor, condiţii de depozitare a mediilor, în baza cărora metoda poate fi aplicată ca atare sau cu mici modificări ce trebuiesc precizate.

Criterii de performanţă: Variaţia numărului de colonii dezvoltate la intervale diferite de timp.

Experimente: Se analizează o matrice de apă. În plăci Petri cu mediul de cultură Slanetz Bartley agar se depun membrane, prin care se filtrează în prealabil câte 100 ml sau 10 ml din proba de analizat şi se incubează plăcile la 37°C. Rezultatele (colonii tipice) se citesc mai întâi la 44 ore, apoi la 48 ore.

Criterii de acceptare: Variaţia procentuală a numărului de colonii ± 15% în condiţii de variaţie a temperaturii sau a timpului de incubare în intervalul specificat de metodă.

8.3. Parametrul de performanţă: Exactitate sau acurateţe

Se urmăreşte concordanţa între valoarea aşteptată şi rezultatul obţinut, prin analizarea diluţiilor succesive, utilizând reactivi de referinţă, respectiv o matrice de concentraţie cunoscută.

Criterii de performanţă: Diferenţa de clasă logaritmică între numărul de germeni aşteptat şi cel obţinut în plăci paralele însămânţate cu diluţii succesive ale probei de referinţă.

Experimente: Plăci însămânţate cu câte 100 ml şi 10 ml probă de referinţă, inoculată în mediul de cultură Slanetz Bartley agar. După termostatarea plăcilor la 37°C timp de 48 de ore, se numără coloniile tipice crescute pe fiecare membrană.

Evaluarea rezultatelor: Comparând numărul de colonii obţinut în plăcile inoculate cu proba de referinţă nediluată şi numărul de colonii obţinute în plăcile inoculate cu diluţia 10^{-1} se observă și se compară diferenţa de clasă logaritmică.

Criterii de acceptare: corespondenţa de clasă logaritmică, cu maxim 20% excepţii.

8.4. Parametrul de performanţă: Liniaritate

Se urmăreşte concordanţa între valoarea aşteptată şi rezultatul obţinut, prin analizarea probei și a diluţiilor zecimale succesive ale acesteia.

Criterii de performanţă: Coeficientul de corelaţie între numărul aşteptat şi cel obţinut de colonii pe membrane.

Experimente: Plăci pe care se depun membrane prin care s-au filtrat câte 100, 10 şi 1 ml probă, pe mediul de cultură Slanetz Bartley agar. După termostatarea plăcilor la 37°C timp de 48 de ore, se numără coloniile tipice dezvoltate.

Evaluarea rezultatelor: Coeficientul de corelaţie r^2 între numărul de bacterii aşteptat şi cel obţinut în serii paralele de plăci.

Criterii de acceptare: $r^2 > 0,9$ pentru cel puţin 90% dintre măsurători.

8.5. Parametrul de performanţă: Precizie în condiţii de repetabilitate

Descriere: Repetabilitatea arată existenţa unor diferenţe semnificative între determinări efectuate în cadrul aceluiaşi laborator, utilizându-se acelaşi analit şi acelaşi echipament.

Experimente: Se lucrează un număr de 10 repetiţii ale unei probe, în aceleaşi condiţii. Se numără coloniile crescute de pe cele 10 plăci de către toţi operatorii, iar pe baza valorilor obţinute se calculează: valoarea medie, deviaţia standard, deviaţia standard relativă.

Evaluarea rezultatelor: Prelucrarea statistică a datelor permite calcularea varianţei relative medii a citirii laboratorului ca întreg, fără vizarea unei persoane anume, care va sta la baza întocmirii incertitudinii de măsurare.

Criterii de acceptare: Coeficientul de variaţie (deviaţia standard relativă) < 20% din parametrul valoric.

8.6. Parametrul de performanţă: Precizie în condiţii de reproductibilitate

Descriere: Reproductibilitatea indică precizia inter-determinări (repetabilitate inter-determinări), prin analiza mai multor replici ale unui material de referinţă, în condiţii diferite.

Experimente: Proba de referinţă (organizator, runda, data)

Evaluarea rezultatelor (furnizate de organizator):

- Număr de participanţi (cu aceeaşi metodă de lucru):
- Rezultat raportat: nr. enterococi /100 ml
- Rezultat desemnat: nr. enterococi /100 ml
- Scor z:

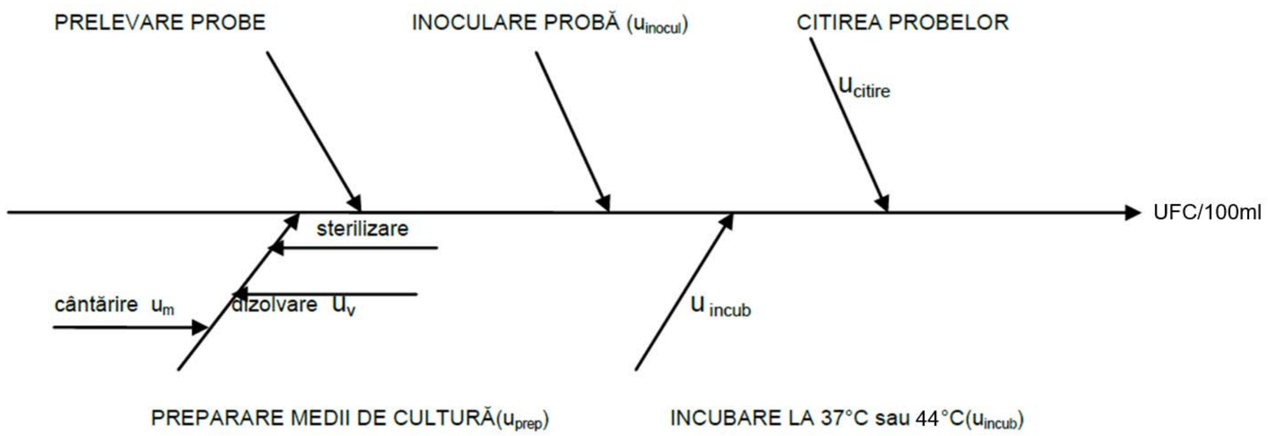
Criterii de acceptare: valoarea scorului z între -2 și 2.

8.7. Parametrul de performanţă: Incertitudinea de măsurare

Descriere: Incertitudinea de măsurare este parametrul asociat rezultatului unei măsurări, care caracterizează împrăştierea valorilor ce în mod rezonabil ar putea fi atribuite măsurandului.

Experimente: Se identifică sursele cuantificabile de incertitudine şi se calculează incertitudinea standard compusă, derivată de prepararea mediilor de cultură, incertitudinea de inoculare a probelor, incertitudinea dată de incubarea probelor și incertitudinea dată de citirea probelor. Se calculează incertitudinea extinsă pentru un interval de încredere de 95%.

Identificarea surselor de incertitudine – diagrama cauză-efect pentru determinarea enterococilor



Unde:

u_{prep} = incertitudine dată de prepararea mediilor de cultură

u_{inoc} = incertitudine dată de inocularea probei cu ajutorul micropipetei

u_{incub} = incertitudinea dată de incubarea la 37°C sau la 44°C

u_{citire} = incertitudinea dată de citirea rezultatelor (numărarea coloniilor)

UFC = unităţi formatoare de colonii.

Conform fişei Calculul de estimare a incertitudinii de măsurare: Incertitudinea extinsă (UE) = nr enterococi /100 ml (valoare log10 și valoare exprimată procentual).

Criterii de acceptare: valoarea incertitudinii de măsurare < 10% din parametrul valoric.

9. Anexe:

- Calculul indicatorilor de performanţă pentru numărarea enterococilor;
- Controlul primar al laboratorului;
- Calculul de estimare a incertitudinii de măsurare;
- Rezultate intercomparare, organizator, runda.

9. **Concluzii:**

Caracteristicile de performanţă ale metodei sunt îndeplinite, metoda este adecvată scopului propus.

FIŞA DE VALIDARE

Parametru	**Rezultat**	**Îndeplinire criteriu**
Matrice	Apă potabilă Apă sintetică	
Analiza	Enterococi (UFC) / 100ml	
Metoda de încercare	Filtrare prin membrană	
Selectivitate/specificitate		
Stabilitate/robusteţe		
Exactitate		
Liniaritate		
Repetabilitate		
Reproductibilitate		
Incertitudine de măsurare		

ACTIVITATE EXPERIMENTALĂ

Validarea unei metode analitice sau validarea unui proces

Concepeţi un proiect de validare pentru o metodă de încercare sau pentru un proces tehnologic, la alegere. Proiectul trebuie să conţină:

1. **Datele de identificare**: nume, prenume, specializare, an;

2. **Titlul proiectului**;

3. **Scopul metodei / procesului** ales;

4. **Principiul metodei / procesului** ales;

5. **Materiale şi echipamente** necesare;

6. **Mod de lucru / operare**: descrierea etapelor, schiţa metodei / procesului;

7. **Menţiuni adiţionale**: detalii relevante despre importanţa metodei / procesului, avantaje şi dezavantaje pe care le oferă metoda analitică / procesul de producţie comparativ cu alte metode / procese, respectarea principiilor GLP / GMP;

8. **Scopul validării**: definiţia și scopul validării (adaptat proiectului);

9. A. **Validarea metodei** analitice...:

- Parametri de performanţă (imaginaţi metode de verificare stabilind criterii de acceptare);
- Identificarea surselor de incertitudine cu reprezentare prin diagrama cauză-efect;
- Fișa de validare;

SAU

B. **Validarea procesului** tehnologic...:

- Identificarea parametrilor critici ai procesului;
- Atribute de calitate (imaginaţi metode de verificare şi criterii de acceptare);
- Matricea de validare pentru echipamente.

10. **Bibliografie**

BIBLIOGRAFIE

Adamson JR. 2008. Validation and facility design. În: Agaloco J, Carleton FJ. (ed) *Validation of pharmaceutical processes*. Informa Healthcare, New York, London

Akao T, Yoshino T, Kobashi K, Hattori M. 2002. Evaluation of salicin as an antipyretic prodrug that does not cause gastric injury. *Planta Med*. 68(8):714-718. doi: 10.1055/s-2002-33792

Aliwarga L, Susanto H, Reynard R, Victoria AV. 2019. UNIFAC model for liquid-liquid phase equilibrium of penicillin G and 6-APA system. *J Kimia Valensi* 5(2):185-193. doi: 10.15408/jkv.v5i2.9869

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215:403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2

ANMDMR 2019. Autorizaţie de punere pe piaţă nr. 11322/2019. https://www.anm.ro/_/_PRO/PRO_11322_11.01.19.pdf

ANMDMR 2016. Autorizaţie de punere pe piaţă nr. 8517/2016. https://www.anm.ro/_/_PRO/PRO_8517_14.01.16.pdf

Balcázar JL, Subirats J, Borrego CM. 2015. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Front Microbiol*. 6:1216. doi: 10.3389/fmicb.2015.01216

Banerjee P, Kemmler E, Dunkel M, Preissner R. 2024. ProTox 3.0: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Res*. 52(W1):W513-W520. doi: 10.1093/nar/gkae303

Barbier L, Ebbers HC, Declerck P, Simoens S, Vulto AG, Huys I. 2020. The efficacy, safety, and immunogenicity of switching between reference biopharmaceuticals and biosimilars: A systematic review. *Clin Pharmacol Ther*. 108(4):734-755. doi: 10.1002/cpt.1836

Barredo JL, Díez B, Alvarez E, Martín JF. 1989. Large amplification of a 35-kb DNA fragment carrying two penicillin biosynthetic genes in high penicillin producing strains of *Penicillium chrysogenum*. *Curr Genet*. 5-6:453-459. doi: 10.1007/BF00340725

Boesten WHJ, Moody HM, Roos EC. 1996. Process for the recovery of ampicillin. Patent WO 1996/030376, European Patent Office

Bønnelykke K, Matheson MC, Pers TH, şi colab. 2013. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies ten loci influencing allergic sensitization. *Nat Genet.* 45(8):902-906 doi: 10.1038/ng.2694

Brakhage AA, Spröte P, Al-Abdallah Q, Gehrke A, Plattner H, Tüncher A. 2004. Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 88:45-90. doi: 10.1007/b99257

Breiden B, Sandhoff K. 2019. Emerging mechanisms of drug-induced phospholipidosis. *Biol Chem.* 401(1):31-46. doi: 10.1515/hsz-2019-0270. Erratum in: *Biol Chem.* 2021. 403(2):251. doi: 10.1515/hsz-2021-0383

Bruns RF, Watson IA. 2012. Rules for identifying potentially reactive or promiscuous compounds. *J Med Chem*. 55(22):9763-9772. doi: 10.1021/jm301008n

Campbell J. 2011. High-throughput assessment of bacterial growth inhibition by optical density measurements. *Curr Protoc Chem Biol.* 3(3):100115. doi: 10.1002/9780470559277.ch100115

Carpa R, Remizovschi A, Burtescu RF, Culda CA, Kryvtsova M, Hasynets Y, Butiuc-Keul A, Dobrotă C, Farkas A, Olah NK. 2022. Salicin content from *Salix alba* L. And *Salix purpurea* L. extracts and its antibacterial effects. *Contrib Bot.* 57:133-142. doi: 10.24193/Contrib.Bot.57.10

Chambless JD, Hunt SM, Stewart PS. 2005. A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials. *Appl Environ Microbiol.* 72(3):2005-2013. doi: 10.1128/AEM.72.3.2005-2013.2006

Clay MD, McLeod EJ. 2012. Detection of salicylic acid in willow bark: an addition to a classic series of experiments in the introductory organic chemistry laboratory. *J Chem Ed.* 89 8):1068-1070. doi: 10.1021/ed300070s

Daina A, Michielin O, Zoete V. 2017. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep.* 7:42717 doi: 10.1038/srep42717

Desborough MJR, Keeling DM. 2017. The aspirin story – from willow to wonder drug. *British J Haematol.* 177:674–683. doi: 10.1111/bjh.14520

Devulapalli SS. 2022. Seven quality characteristics of sterile drug product. https://www.linkedin.com/pulse/seven-quality-characteristics-sterile-drug-product-devulapalli/

Directive 2001/20/EC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use. *European Parliament and Council*

Directive 2004/9/EC on the inspection and verification of good laboratory practice (GLP). *European Parliament and Council*

Directive 2004/10/EC on the harmonisation of laws, regulations and administrative provisions relating to the application of the principles of good laboratory practice and the verification of their applications for tests on chemical substances. *European Parliament and Council*

Doneva N, Doytchinova I, Dimitrov I. 2021. Predicting immunogenicity risk in biopharmaceuticals. *Symmetry* 13:388. doi: 10.3390/sym13030388

EMA/CHMP/CVMP/QWP/749073/2016 Guideline on process validation for finished products - information and data to be provided in regulatory submissions. *Eurpean Medicines Agency*

EMA/HMPC/80628/2016 Assessment report on *Salix* [various species including *S. purpurea* L., *S. daphnoides* Vill., *S. fragilis* L.], cortex. *European Medicines Agency*

EMA/HMPC/434892/2010 Community herbal monograph on *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. (= *Spiraea ulmaria* (L.)), *flos. European Medicines Agency*

EMA/CHMP/CVMP/QWP/BWP/70278/2012 Guideline on process validation for finished products - information and data to be provided in regulatory submissions. *European Medicines Agency*

EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Guideline on bioanalytical method validation. *European Medicines Agency*

EUCAST 2024a. EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing, Version 12.0. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology (2024)

EUCAST 2024b. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints (2024)

Farkas A, Bocoş B, Drăgan-Bularda M, Crăciunaş C. 2014. Effect of different disinfectants against biofilm bacteria. *Studia UBB Biologia* 59(1):5-20

Farkas A. 2016. Testarea susceptibilităţii la antibiotice prin metoda antibiogramei. În: Coman, C. (ed.) *Ghid metodologic de monitorizare a antibioticelor şi a rezistenţei la antibiotice în mediul înconjurător*. Editura Accent, Cluj-Napoca, România, pp. 79-104

Farkas A. 2021. *Biotehnologii farmaceutice*. Editura Presa Universitară Clujeană, Cluj-Napoca

FDA 2011. Guidance for industry. Process validation: General principles and practices. *Food and Drug Administration*

FDA 2015. Guidance for industry. Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics. *Food and Drug Administration*

Fierro F, Barredo JL, Díez B, Gutierrez S, Fernández FJ, Martín JF. 1995. The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92(13):6200-6204. doi: 10.1073/pnas.92.13.6200

Fierro F, Vaca I, Castillo NI, García-Rico RO, Chávez R. 2022. *Penicillium chrysogenum*, a vintage model with a cutting-edge profile in biotechnology. *Microorg.* 10(3):573. doi: 10.3390/microorganisms10030573

Franceschini F, Bottau P, Caimmi S, Cardinale F, Crisafulli G, Liotti L, Saretta F, Bernardini R, Mori F, Caffarelli C. 2019. Mechanisms of hypersensitivity reactions induced by drugs. *Acta Biomed.* 90(3-S):44-51. doi: 10.23750/abm.v90i3-S.8160

Fry CB. 1982. What we see that makes us nervous, Guest Editorial, *Pharm Eng.* 05:10-11.

Gleeson MP. 2008. Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb. *J Med Chem*. 51(4):817-834. doi: 10.1021/jm701122q

Greule A, Zhang S, Paululat T, Bechthold A. 2017. From a natural product to its biosynthetic gene cluster: A demonstration using polyketomycin from *Streptomyces diastatochromogenes* Tü6028. *J Vis Exp*. 13(119):54952. doi: 10.3791/54952

Guan L, Yang H, Cai Y, Sun L, Di P, Li W, Liu G, Tang Y. 2018. ADMET-score - a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. *Med Chem Comm.* 10(1):148-157. doi: 10.1039/c8md00472b

Guzmán-Chávez F, Zwahlen RD, Bovenberg RAL, Driessen AJM. 2018. Engineering of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* as cell dactory for natural products. *Front Microbiol*. 9:2768. doi: 10.3389/fmicb.2018.02768

Haney EF, Trimble MJ, Cheng JT, Vallé Q, Hancock REW. 2018. Critical assessment of methods to quantify biofilm growth and evaluate antibiofilm activity of host defence peptides. *Biomol*. 8(2):29. doi: 10.3390/biom8020029

Hoffman RJ, Nelson LS, Hoffman RS. 2002. Use of ferric chloride to identify salicylate-containing poisons. *J Toxicol Clin Toxicol*. 40(5);547-549. doi: 10.1081/CLT-120014643

Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA. 2011. Fleming's penicillin-producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus*. 2:87–95. doi: 10.5598/imafungus.2011.02.01.12

Houbraken J, Kocsubé S, Visagie CM, Yilmaz N, Wang XC, Meijer M, Kraak B, Hubka V, Bensch K, Samson RA, Frisvad JC. 2020. Classification of *Aspergillus, Penicillium, Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Stud Mycol*. 95:5-169. doi: 10.1016/j.simyco.2020.05.002

Hughes JD, Blagg J, Price DA, Bailey S, Decrescenzo GA, Devraj RV, Ellsworth E, Fobian YM, Gibbs ME, Gilles RW, Greene N, Huang E, Krieger-Burke T, Loesel J, Wager T, Whiteley L, Zhang Y. 2008. Physiochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. *Bioorg Med Chem Lett*. 18(17):4872-5. doi: 10.1016/j.bmcl.2008.07.071

Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. 2011. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol.* 162(6):1239-1249. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x

Iavicoli I, Fontana L, Agathokleous E, Santocono C, Russo F, Vetrani I, Fedele M, Calabrese EJ. 2021. Hormetic dose responses induced by antibiotics in bacteria: A phantom menace to be thoroughly evaluated to address the environmental risk and tackle the antibiotic resistance phenomenon. *Sci Total Environ*. 798:149255. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149255

ICH 2000. Topic Q6A Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances - Scientific guideline, *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*

ICH 1999. Topic Q6B Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products, *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*

ICH 2023. Validation of analytical procedures Q2(R2), *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*

ISO 7899-2:2000 Water quality — Detection and enumeration of intestinal enterococci. Part 2: Membrane filtration method. *International Association for Standardization*

ISO 14644-1:2015 Cleanrooms and associated controlled environments. *International Association for Standardization*

ISO 16140-1:2016 Microbiology of the food chain — Method validation. Part 1: Vocabulary. *International Association for Standardization*

ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. *International Association for Standardization*

ISO 20776-1:2019 Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. *International Association for Standardization*

ISO 20776-2:2021 Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices against reference broth micro-dilution. *International Association for Standardization*

Kerkhof PT, Kuipers RH, Walraven HG. 1998. Improved process for the fermentative production of penicillin. Patent WO 1998/048039, *European Patent Office*

Kessler M, Goldsmith D, Schellekens H. 2006. Immunogenicity of biopharmaceuticals, *Nephrol Dialys Transplant*. 21(5):v9–v12, doi: 10.1093/ndt/gfl476

Krause T, Röckendorf N, Meckelein B, Sinnecker H, Schwager C, Möckel S, Jappe U, Frey A. 2020. IgE epitope profiling for allergy diagnosis and therapy - parallel analysis of a multitude of potential linear epitopes using a high throughput screening platform. *Front Immunol.* 11:565243. doi: 10.3389/fimmu.2020.565243

Krishna M, Nadler SG. 2016. Immunogenicity to biotherapeutics – The role of anti-drug immune complexes. *Front Immunol*. 7:21. doi: 10.3389/fimmu.2016.00021

Kundu S, Chakravarty I, Ojha S, Kundu K. 2019. Design and development of antibiotic fermentation using different processing strategies: Challenges and perspectives. În: Shukla P. (ed) *Applied microbiology and bioengineering*. Academic Press. Elsevier. pp. 163-183

Leitão AL, García-Estrada C, Ullán RV, Guedes SF, Martín-Jiménez P, Mendes B, Martín JF. 2012. *Penicillium chrysogenum* var. halophenolicum, a new halotolerant strain with potential in the remediation of aromatic compounds in high salt environments. *Microbiol Res.* 167(2):79-89. doi: 10.1016/j.micres.2011.03.004

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 46(1-3):3-26. doi: 10.1016/s0169-409x(00)00129-0

Margetts AJ, Lundsberg-Nielsen, L. 2021. The history and future of validation. Pharmaceutical Engineering. https://ispe.org/pharmaceutical-engineering/march-april-2021/history-future-validation

Martín JF, Casqueiro J, Kosalková K, Marcos AT, Gutiérrez S. 1999. Penicillin and cephalosporin biosynthesis: mechanism of carbon catabolite regulation of penicillin production. *Antonie Van Leeuwenhoek* 75(1-2):21-31. doi: 10.1023/a:1001820109140

Martín JF. 2020. Insight into the genome of diverse *Penicillium chrysogenum* strains: Specific genes, cluster duplications and DNA fragment translocations. *Int J Mol Sci.* 21(11):3936. doi: 10.3390/ijms21113936

Mattei AE, Gutierrez AH, Martin WD, Terry FE, Roberts BJ, Rosenberg AS, De Groot AS. 2022. In silico immunogenicity assessment for sequences containing unnatural amino acids: A method using existing in silico algorithm infrastructure and a vision for future enhancements. *Front Drug Discov.* 2:952326. doi: 10.3389/fddsv.2022.952326

Maynard DW. 2008. Validation of critical utilities. În: Agaloco J, Carleton FJ (ed.) *Validation of pharmaceutical processes*. Informa Healthcare, New York, London

Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA. 2005. Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protoc Microbiol.* Chapter 1:Unit 1B.1. doi: 10.1002/9780471729259.mc01b01s00

Miethke M, Pieroni M, Weber T și colab. 2021. Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nat Rev Chem*. 5:726–749. doi: 10.1038/s41570-021-00313-1

Mihăescu G. 2003. *Imunologie și imunochimie*. Universitatea din București. Ebook https://ebooks.unibuc.ro/biologie/mihaiescu/

Mira P, Yeh P, Hall BG. 2022. Estimating microbial population data from optical density. *PLoS One*. 17(10):e0276040. doi: 10.1371/journal.pone.0276040

Muntean V. 2013. *Microbiologie industrială*. Presa Universitară Clujeană, Cluj-Napoca

Nekhoroshev SV, Nekhorosheva AV, Sabutova AB, Botirov EK, Drenin AA, Slepchenko GB, Gornikov NV. 2020. Hydrolytic stability of aqueous solutions of salicin. *Pharm Chem J.* 54:857–860. doi: 10.1007/s11094-020-02287-8

Nicholson LB. 2016. The immune system. *Essays Biochem.* 60(3):275-301. doi: 10.1042/EBC20160017

Nijland JG, Ebbendorf B, Woszczynska M, Boer R, Bovenberg RA, Driessen AJ. 2010. Nonlinear biosynthetic gene cluster dose effect on penicillin production by *Penicillium chrysogenum. Appl Environ Microbiol.* 76(21):7109-7115. doi: 10.1128/AEM.01702-10

Niu H, Gu J, Zhang Y. 2024. Bacterial persisters: Molecular mechanisms and therapeutic development. *Signal Transduct Target Ther.* 9(1):174. doi: 10.1038/s41392-024-01866-5

O'Toole GA. 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp.* 47:2437. doi: 10.3791/2437

Pathak A, Nowell RW, Wilson CG, Ryan MJ, Barraclough TG. 2020. Comparative genomics of Alexander Fleming's original *Penicillium* isolate (IMI 15378) reveals sequence divergence of penicillin synthesis genes. *Sci Rep*. 10(1):15705. doi: 10.1038/s41598-020-72584-5

Ph. Eur. 2023. European Pharmacopoeia. 11th edition. Strasbourg: *Directorate for the Quality of Medicines and Health Care of the Council of Europe*

Pichler WJ, Hausmann O. 2016. Classification of drug hypersensitivity into allergic, p-i, and pseudo-allergic forms. *Int Arch Allergy Immunol*. 171(3-4):166-179. doi: 10.1159/000453265

Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NN, Bachor OA, Stevanovic S. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50:213-219

Saha S, Raghava GPS. 2006. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. Nucleic Acids Res. 34(2):W202–W209. doi: 10.1093/nar/gkl343

Sharma N, Patiyal S, Dhall A, Pande A, Arora C, Raghava GPS. 2021. AlgPred 2.0: An improved method for predicting allergenic proteins and mapping of IgE epitopes, Brief Bioinf. 22(4): bbaa294. doi: 10.1093/bib/bbaa294

Sionov RV, Steinberg D. 2022. Targeting the holy triangle of quorum sensing, biofilm formation, and antibiotic resistance in pathogenic bacteria. *Microorg.* 10(6):1239. doi: 10.3390/microorganisms10061239

Skogman ME, Vuorela PM, Fallarero A. 2016. A platform of anti-biofilm assays suited to the exploration of natural compound libraries. *J Vis Exp.* 118:54829. doi: 10.3791/54829

Smith DJ, Bull JH, Edwards J, Turner G. 1989. Amplification of the isopenicillin N synthetase gene in a strain of *Penicillium chrysogenum* producing high levels of penicillin. *Mol Gen Genet.* 216(2-3):492-497. doi: 10.1007/BF00334395

Stepanović S, Vuković D, Dавić I, Savić B, Ŝvabić-Vlahović M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Meth.* 40:175–179. doi: 10.1016/s0167-7012(00)00122-6

Šmidák R, Kralovičová M, Ševčíková B, Jakubčová M, Kormanec J, Timko J, Turňa J. 2010. Sequence analysis and gene amplification study of the penicillin biosynthesis gene cluster from different strains of *Penicillium chrysogenum*. *Biologia* 65:1–6. doi: 10.2478/s11756-009-0216-2

Tawfeek N, Mahmoud MF, Hamdan DI, Sobeh M, Farrag N, Wink M, El-Shazly AM. 2012. Phytochemistry, pharmacology and medicinal uses of plants of the genus *Salix*: An updated review. *Front Pharmacol.* 12:593856. doi: 10.3389/fphar.2021.593856

Toiu A, Vlase L, Oniga I, Benedec D, Tămaș M. HPLC analysis of salicylic derivatives from natural products. *Farmacia* 59(1):106-112

della Veneria RR. 2023. The history and purpose of Good Laboratory Practice (GLP) regulations in the Life-science industry. https://www.linkedin.com/pulse/history-purpose-good-laboratory-practice-glp-industry-roberto/

Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong SB, Klaassen CH, Perrone G, Seifert KA, Varga J, Yaguchi T, Samson RA. 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud Mycol.* 78:343-71. doi: 10.1016/j.simyco.2014.09.001

Visagie CM, Yilmaz N, Kocsubé S, Frisvad JC, Hubka V, Samson RA, Houbraken J. 2024. A review of recently introduced *Aspergillus, Penicillium, Talaromyces* and other Eurotiales species. *Stud Mycol.* 107:1-66. doi: 10.3114/sim.2024.107.01

Wang L, Wang N, Zhang W, Cheng X, Yan Z, Shao G, Wang X, Wang R, Fu C. 2022. Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Signal Transduct Target Ther.* 7(1):48. doi: 10.1038/s41392-022-00904-4

Welch K, Cai Y, Strømme M. 2012. A method for quantitative determination of biofilm viability. *J Funct Biomater*. 3(2):418-31. doi: 10.3390/jfb3020418

Xiong G, Wu Z, Yi J, Fu L, Yang Z, Hsieh C, Yin M, Zeng X, Wu C, Lu A, Chen X, Hou T, Cao D. 2021. ADMETlab 2.0: An integrated online platform for accurate and comprehensive

predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Res.* 49(W1):W5-W14. doi: 10.1093/nar/gkab255

Yuan G, Czajka JJ, Dai Z, Hu D, Pomraning KR, Hofstad BA, Kim J, Robles AL, Deng S, Magnuson JK. 2023. Rapid and robust squashed spore/colony PCR of industrially important fungi. *Fungal Biol Biotechnol.* 10(1):15. doi: 10.1186/s40694-023-00163-0

Yurina V, Adianingsih OR. 2022. Predicting epitopes for vaccine development using bioinformatics tools. *Ther Adv Vaccines Immunother.* 10:25151355221100218. doi: 10.1177/25151355221100218

Zhang J, Tao A. 2015. Antigenicity, immunogenicity, allergenicity. *Allergy Bioinf.* 8:175–186. doi: 10.1007/978-94-017-7444-4_11

Ziemons S, Koutsantas K, Becker K, Dahlmann T, Kück U. 2017. Penicillin production in industrial strain *Penicillium chrysogenum* P2niaD18 is not dependent on the copy number of biosynthesis genes. *BMC Biotechnol*. 17(1):16. doi: 10.1186/s12896-017-0335-8

Siteografie

În ordinea apariţiei:

www.eupati.eu

https://www.who.int/clinical-trials-registry-platform

www.clinicaltrials.gov

www.clinicaltrialsregister.eu

https://www.anm.ro/medicamente-de-uz-uman/farmacovigilenta/raporteaza-o-reactie-adversa/

https://www.anm.ro/_/_PRO/PRO_11322_11.01.19.pdf

https://www.anm.ro/_/_PRO/PRO_8517_14.01.16.pdf

https://www.anm.ro/medicamente-de-uz-uman/nomenclatorul-medicamentelor-de-uz-uman/

http://www.aspergilluspenicillium.org

https://www.jove.com/v/54952/from-a-natural-product-to-its-biosynthetic-gene-cluster-a-demonstration-using-polyketomycin-from-streptomyces-diastatochromogenes-t%C3%BC6028

www.eucast.org

www.clsi.org

https://www.jove.com/v/2437/microtiter-dish-biofilm-formation-assay

https://app.jove.com/v/54829/a-platform-of-anti-biofilm-assays-suited-to-the-exploration-of-natural-compound-libraries

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/

https://primer3.ut.ee/

https://perlprimer.sourceforge.net/

https://primerdigital.com/fastpcr.html

www.uniprot.org

www.thermofisher.com

https://www.thermofisher.com/ro/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html

https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/ethical-use-animals-medicine-testing

http://www.drugbank.ca/

https://www.ebi.ac.uk/chembldb/

http://cheminfo.charite.de/withdrawn/

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/

http://lmmd.ecust.edu.cn/admetsar2/

https://admetmesh.scbdd.com/service/evaluation/index

http://www.swissadme.ch/index.php

https://tox.charite.de/protox3/

www.gabionline.net

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

http://www.syfpeithi.de/0-Home.htm

https://webs.iiitd.edu.in/raghava/algpred2/

http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/

https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/antigenic

https://www.fda.gov/drugs/pharmaceutical-quality-resources/current-good-manufacturing-practice-cgmp-regulations

https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/research-development/compliance-research-development/good-manufacturing-practice

https://www.ich.org/page/quality-guidelines

CUPRINS

ISBN: 978-606-37-2335-3